

**L'INHIBITION DES DÉSACÉTYLASES PAR LE BUTYRATE AFFECTE
L'EXPRESSION DES GÈNES DE RÉPONSE INFLAMMATOIRE DE FAÇON
SPÉCIFIQUE DANS LES CELLULES INTESTINALES ÉPITHÉLIALES HUMAINES**

par

Mylène Blais

Département d'Anatomie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Université de Sherbrooke

**Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
de Philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire**

Juillet 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-494-14842-X

Our file Notre référence

ISBN: 0-494-14842-X

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	II
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	X
ABRÉVIATIONS.....	XI
PUBLICATIONS.....	XVI
RÉSUMÉ.....	XVII
 INTRODUCTION.....	 1
L'épithélium intestinal.....	1
Le butyrate.....	3
L'inhibition des désacétylases.....	5
L'inflammation intestinale.....	10
Les gènes sérum amyloïde A2 (SAA2) et interleukine-8 (IL-8).....	11
Les facteurs de transcription NF- κ B et C/EBP.....	13
Principaux objectifs du projet.....	17
 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	 19
<i>Culture cellulaire.....</i>	<i>19</i>
<i>Détection de modifications sur les histones.....</i>	<i>19</i>
<i>Analyse par buvardage Northern.....</i>	<i>21</i>
<i>Gels de rétention (EMSA).....</i>	<i>22</i>

<i>Mutations site-spécifique du promoteur SAA2 humain.....</i>	24
<i>Transfections transitoires et essais luciférase.....</i>	25
<i>Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....</i>	26
<i>Analyse par micropuces d'ADN.....</i>	29
<i>Analyse par RT-PCR.....</i>	30
<i>Immunofluorescence indirecte.....</i>	31
<i>Analyse par buvardage Western.....</i>	33
 RÉSULTATS.....	 35
1. Mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression des gènes de réponse inflammatoire SAA2 et IL-8 par les inhibiteurs de désacétylases dans les cellules de carcinome de côlon humain Caco-2/15.....	35
1.1. L'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases induisent de façon synergique l'expression du gène de réponse inflammatoire SAA2 et permettent le maintien des niveaux d'expression de l'IL-8 à court terme.....	35
1.2. Un traitement transitoire avec l'IL-1 β ou les inhibiteurs de désacétylases suffit pour enclencher l'induction de l'expression de SAA2.....	39
1.3. L'activité de liaison à l'ADN in vitro du facteur de transcription NF- κ B induite par l'IL-1 β n'est pas affectée par les inhibiteurs de désacétylases.....	44

1.4. La régulation par l'IL-1 β de l'activité de liaison à l'ADN in vitro des isoformes C/EBP α et C/EBP δ est modulée par les inhibiteurs de désacétylases.....	46
1.5. Les sites de liaisons à l'ADN de C/EBP et de NF- κ B sur le promoteur SAA2 jouent un rôle différent au niveau de la synergie entre les inhibiteurs de désacétylases et l'IL-1 β	49
1.6. L'induction de l'expression de SAA2 requiert à la fois les changements au promoteur apportés par le butyrate et ceux apportés par l'IL-1 β dans les cellules Caco-2/15 sous-confluentes.....	51
2- Effets du butyrate sur l'expression des gènes de réponse inflammatoire dans les cellules intestinales épithéliales humaines.....	55
2.1. Induction rapide des niveaux globaux d'acétylation sur les histones par le butyrate.....	55
2.2. Le butyrate augmente l'activité de liaison à l'ADN in vitro de NF- κ B dans les cellules non-induites et diminue les niveaux de la liaison à l'ADN de C/EBP induits par l'IL-1 β	55
2.3. L'IL-1 β et le butyrate contrôlent de façon spécifique l'expression des gènes de réponse inflammatoires SAA2 et IL-8 dans les cellules HIEC-6.....	59
2.4. Le butyrate joue un double rôle au niveau de la régulation des gènes de réponse inflammatoire dans les cellules HIEC-6.....	61

3- Modulation de l'expression des désacétylases dans les cellules intestinales épithéliales et rôle des désacétylases dans la régulation de l'expression de gènes de réponse inflammatoire.....	72
3.1. Les niveaux d'acétylation induits sur les histones par les inhibiteurs de désacétylases sont maintenus uniquement dans les cellules Caco-2/15 prolifératives.....	72
3.2. Les niveaux globaux d'acétylation sont diminués dans les cellules de la villosité de l'épithélium intestinal.....	72
3.3. L'expression de la désacétylase HDAC3 est plus élevée dans les cellules de la crypte de l'épithélium intestinal.....	74
3.4. Les niveaux d'expression des HDACs 3, 4 et 6 sont diminués graduellement après l'atteinte de la confluence des cellules Caco-2/15.....	77
3.5. La surexpression des HDACs 3 et 4 réduit significativement les niveaux d'expression de base d'IL-8luc.....	77
3.6. L'induction de l'activité transcriptionnelle du promoteur de SAA2 est réduite par la surexpression des HDACs 1, 3 et 4.....	80
DISCUSSION.....	83
1- Activation synergique spécifique du promoteur du gène SAA2 par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases.....	83

2- Effets différentiels du butyrate lors de la réponse inflammatoire médiée par l'IL-1 β dans les cellules intestinales épithéliales humaines.....	90
3- Modulation spécifique de l'expression de désacétylases impliquées dans la régulation de gènes de réponse inflammatoire par la différenciation cellulaire.....	97
CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES.....	103
REMERCIEMENTS.....	108
BIBLIOGRAPHIE.....	110

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Anatomie de l'épithélium intestinal.....	2
Figure 2.	Comparaison entre l'épithélium de l'intestin et du côlon.....	4
Figure 3.	Structure moléculaire du butyrate et du Trichostatin A, et inhibition des désacétylases.....	6
Figure 4.	Acétylation par les histones acétyltransférases et désacétylation par les histones désacétylases.....	8
Figure 5.	Modèle proposé pour la régulation de la voie de signalisation de NF- κ B par les désacétylases.....	14
Figure 6.	Effet des inhibiteurs de désacétylases sur l'induction de l'expression des gènes de réponse inflammatoire SAA2 et IL-8 par l'IL-1 β	36
Figure 7.	Régulation de l'activité transcriptionnelle des promoteurs SAA2 et IL-8 par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases.....	38
Figure 8.	Réversibilité de l'induction de l'acétylation des histones par les inhibiteurs de désacétylases.....	41
Figure 9.	Établissement de l'expression synergique de SAA2 par traitements transitoires avec les inhibiteurs de désacétylases ou avec l'IL-1 β	43
Figure 10.	Effet des inhibiteurs de désacétylases sur l'induction de l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B par l'IL-1 β	45
Figure 11.	Effet des inhibiteurs de désacétylases sur l'induction de l'activité de liaison à l'ADN des C/EBP par l'IL-1 β	47

Figure 12. Régulation de l'expression des isoformes C/EBP α et C/EBP δ par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases.....	48
Figure 13. Rôle des sites de liaison à l'ADN de C/EBP et NF- κ B sur le promoteur SAA2 au niveau de la synergie réalisée par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases.....	50
Figure 14. Induction de modifications sur le promoteur proximal SAA2 et IL-8 par l'IL-1 β et le butyrate.....	52
Figure 15. Effet des inhibiteurs de désacétylases sur les niveaux d'acétylation des histones dans les cellules intestinales épithéliales HIEC-6.....	56
Figure 16. Régulation de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription NF- κ B et C/EBP par les inhibiteurs de désacétylases.....	58
Figure 17. Régulation de l'expression des gènes SAA2 et IL-8 par les inhibiteurs de désacétylases dans les cellules intestinales épithéliales HIEC-6.....	60
Figure 18. Régulation différentielle de l'expression des gènes de réponse inflammatoire par le butyrate.....	71
Figure 19. Régulation de l'induction des niveaux d'acétylation sur les histones induits par l'état de prolifération et de différenciation cellulaire des cellules Caco-2/15.....	73
Figure 20. Modulation des niveaux d'acétylation dans l'axe crypte-villosité du jéjunum fœtal humain.....	75
Figure 21. Régulation de l'expression des HDACs 1, 3, 4 et 6 au niveau de l'axe crypte-villosité du jéjunum fœtal humain.....	76

Figure 22. Régulation de l'expression des HDACs 1, 3, 4 et 6 par l'état de prolifération et de différenciation cellulaire des cellules Caco-2/15.....	78
Figure 23. Rôle des HDACs 1, 3, 4 et 6 dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de base des promoteurs SAA2 et IL-8.....	79
Figure 24. Implication des HDACs 1, 3, 4 et 6 au niveau de la régulation de l'activité transcriptionnelle sur les promoteurs SAA2 et IL-8 induits par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases.....	82

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Classification des gènes contrôlés par le NaBu.....	62
Tableau 2.	Liste d'une sélection de gènes réprimés par le NaBu.....	64
Tableau 3.	Liste d'une sélection de gènes induits par le NaBu.....	65
Tableau 4.	Liste des gènes de réponse de défense et de réponse inflammatoire réprimés plus de 2 fois par le NaBu.....	66
Tableau 5.	Liste des gènes de réponse de défense et de réponse inflammatoire induits plus de 2 fois par le NaBu.....	67
Tableau 6.	Régulation des gènes impliqués dans la réponse de défense et de réponse inflammatoire par l'IL-1 β et le NaBu.....	69

ABRÉVIATIONS

°C:	degré celsius
µg:	microgramme
µl:	microlitre
µM:	micromolaire
µm:	micron
ac:	anticorps
ACTR:	Activateur du récepteur à l'hormone thyroïdienne et à l'acide rétinoïque
ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	acide désoxyribonucléique complémentaire
AP:	protéine d'activation
ARN:	acide ribonucléique
ARNm:	acide ribonucléique messenger
ATP:	adénosine triphosphate
C/EBP:	CCAAT/enhancer binding protein
C:	Caco-2/15 confluentes
C3:	complément 3
CBP:	protéine liant CREB
CCL:	chemokine à motif C-C
CCN:	famille de régulateur de croissance comprenant <i>cef10/cyr61</i>
CDK:	kinase dépendante des cyclines
CIA:	promoteurs dont l'accessibilité est constitutive et immédiate

cps:	compte par seconde
CSF:	facteur de stimulation des colonies
CXCL:	chemokine à motif C-X-C
DAVID:	banque de données pour annotations, visualisation et découvertes intégrées
dCTP:	deoxy-cytidine-triphosphate
DMEM:	milieu d' Eagle modifié de Dulbecco
DSS:	Dextran sulfate de sodium
DTT:	dithiothréitol
EDTA:	disodium éthylènediamine tétraacétate
EGF:	facteur de croissance épidermique
EGTA:	éthylèneglycol-bis-(β -aminoéthyl éther) acide tétraacétique
EKLF:	Facteur de transcription Erythroid Krüppel-like
FBS:	sérum bovin fœtal
FITC:	fluorescéine isothiocyanate
GAPDH:	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
h:	heure
H3:	histone 3
H4:	histone 4
HAT:	histone acétyltransférase
HDAC:	histone désacétylase
HDLP:	HDAC de la bactérie <i>Aquifex aeolicus</i> (Histone Deacetylase-Like Protein)
HEPES:	4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthane sulfonate
HMG:	groupe de protéines de haute mobilité (high mobility group)

HNF:	facteur nucléaire hépatocytaire
I κ B:	inhibiteur-kappa B
IFN:	interféron
IKK:	kinase pour l'inhibiteur-kappa B
IL:	interleukine
JNK:	kinase c-Jun N-terminal
M:	molaire
MAPK:	protéine kinase activée par les mitogènes
MCP:	cofacteur de protéine membranaire
mg:	milligramme
min:	minute
MIP:	protéine inflammatoire des macrophages
ml:	millilitre
mM:	millimolaire
MOPS:	acide sulfonique 3-(-N-Morpholino) propane
NaBu:	butyrate de sodium
NAD ⁺ :	nicotinamide adenine dinucléotide
NAP:	protéine d'ancrage nucléaire
NF- κ B:	facteur nucléaire-kappa B
ng:	nanogramme
nm:	nanomètre
NP-40:	nonidet P-40
NRB:	tampon de suspension nucléaire

OCT:	composé de température de coupe optimale
OptiMEM:	milieu d'Eagle modifié optimum
P/CAF:	facteur associé à p300/CBP
PBS:	tampon phosphate salin
P-C:	Caco-2/15 post-confluentes
PCR:	réaction de polymérisation en chaîne
PMSF:	phenyl methyl sulfonyl fluoride
PTPN:	protéines tyrosine phosphatase (non-récepteur)
PVDF:	Polyvinylidene fluoride
RANTES:	protéine régulée par activation, exprimée et sécrétée par les cellules T
RLA:	promoteurs dont l'accessibilité est tardive et régulée
RPM:	tour par minute
RT:	transcription réverse
SAA:	sérum amyloïde A
S-C:	Caco-2/15 sous-confluentes
SDS:	dodécyl sulfate de sodium
SF:	facteur d'épissage
SRC:	tyrosine kinase à domaines SH2, SH3
SSC:	solution saline au citrate
TBE:	tampon tris-borate
TBS:	tampon tris salin
TCF:	facteur de transcription spécifique aux cellule T
TE:	Tampon tris-EDTA

TEMED:	tétraméthyléthylènediamine
TNF:	facteur de nécrose de tumeur
TSA:	Trichostatin A
U:	unité
UB:	protéine ubiquitine ligase
UNIQID:	identification selon la banque de données Unigene
UV:	ultraviolet
V:	volts

PUBLICATIONS

- 1- Houde M., Laprise P., Jean D., Blais M., Asselin C. et Rivard N. (2001) Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 MAP Kinase that regulates the homeobox transcription factor cdx2. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**: 21885-21894.
- 2- Gheorghiu I., Deschênes C., Blais M., Boudreau F., Rivard N. et Asselin C. (2001) Role of specific CCAAT/enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells, *J. Biol. Chem.* **276**: 44331-44337.
- 3- Blais M., Désilets A. et Asselin C. (2005) Synergy between deacetylase inhibitors and IL-1 β in activation of the serum amyloid A2 gene promoter. *DNA Cell. Biol.* **24**: 209-217.
- 4- Blais M. et Asselin C. (2005) Dual effect of butyrate on IL-1 β -mediated intestinal epithelial cell inflammatory response. En préparation.

**L'INHIBITION DES DÉSACÉTYLASES PAR LE BUTYRATE AFFECTE
L'EXPRESSION DES GÈNES DE RÉPONSE INFLAMMATOIRE DE FAÇON
SPÉCIFIQUE DANS LES CELLULES INTESTINALES ÉPITHÉLIALES
HUMAINES**

par

Mylène Blais

Thèse présentée à la faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke en vue de
l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire.

Dans l'intestin, la régulation de l'expression des gènes de réponse inflammatoire est cruciale pour le maintien de l'homéostasie et de l'intégrité de l'épithélium. En effet, un déséquilibre entre l'expression de gènes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires peut avoir des conséquences importantes et mener à l'inflammation chronique du tissu. Le butyrate, un acide gras à chaîne courte produit par la microflore intestinale, semble avoir des effets bénéfiques sur la réponse inflammatoire intestinale, mais les mécanismes moléculaires précis impliqués dans cette régulation sont plutôt vagues. Dans cette étude, nous avons vérifié l'effet de l'inhibition des désacétylases par butyrate sur l'expression de gènes de réponse inflammatoire dans deux modèles de cellules intestinales épithéliales humaines, soient les cellules de carcinome de côlon humain Caco-2/15 et les cellules intestinales épithéliales fœtales humaines HIEC-6. Nous avons également vérifié l'importance de l'activité des désacétylases sur l'activité transcriptionnelle des promoteurs de gènes de réponse inflammatoire SAA2 et IL-8. Nos résultats démontrent que l'inhibition des désacétylases affecte spécifiquement l'induction de l'expression des gènes de réponse inflammatoire SAA2 et IL-8 par l'IL-1 β via le recrutement de modifications similaires et complémentaires sur les promoteurs. L'état de différenciation cellulaire et la présence de stimuli pro-inflammatoires affectent la réponse des gènes de réponse inflammatoire au butyrate. Ces différences semblent impliquer la régulation de l'expression de désacétylases spécifiques. Ensemble, ces résultats suggèrent donc que l'action bénéfique du butyrate sur la réponse inflammatoire intestinale impliquerait le recrutement spécifique et la modulation de l'activité des différentes désacétylases sur les promoteurs des gènes de réponse inflammatoire.

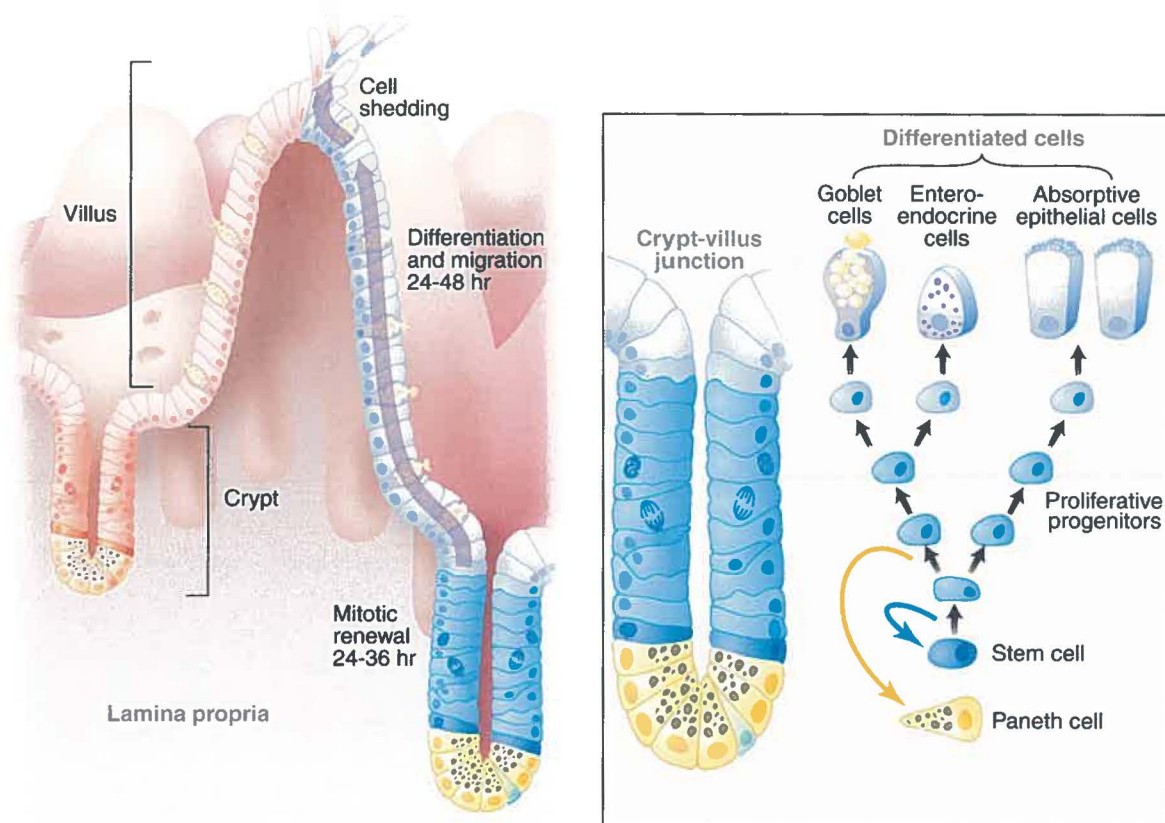
INTRODUCTION

L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL

L'épithélium intestinal constitue une barrière importante entre l'intérieur du corps et les agents externes présents dans le tube digestif. Il est constitué d'une seule couche de cellules épithéliales qui, en plus de jouer un rôle majeur au niveau de la défense du corps contre les pathogènes présents dans l'intestin, ont comme fonctions principales la sécrétion, la digestion et l'absorption des nutriments. Afin d'assumer cette lourde tâche, le maintien de l'homéostasie des cellules intestinales épithéliales est donc d'une importance vitale.

L'épithélium intestinal est composé de deux compartiments, soient la crypte et la villosité (Fig. 1) (Radtke et Clevers, 2005). La crypte est constituée de cellules souches prolifératives qui vont donner naissance à plusieurs types de cellules différenciées recouvrant la lamina propria constituée de cellules immunitaires et de fibroblastes. Les entérocytes, les cellules à mucus et les cellules entéroendocrines produites à la suite de la différenciation des cellules souches migrent le long de la villosité où elles seront éventuellement éliminées par apoptose, alors que les cellules de Paneth sont maintenues dans la crypte. Ainsi, l'épithélium intestinal se renouvelle constamment grâce à l'approvisionnement continu de nouvelles cellules provenant de la crypte. Contrairement à l'épithélium intestinal, l'épithélium du côlon ne démontre pas de villosités. Les cellules prolifératives sont plutôt établies dans le deux-tiers inférieur de la crypte, alors que les

Figure 1. Anatomie de l'épithélium intestinal. GAUCHE : L'épithélium intestinal est composé de deux compartiments : la crypte (crypt) et la villosité (villus). DROITE : Les cellules souches (Stem cells) de la crypte donnent éventuellement naissance à plusieurs types de cellules différenciées: les entérocytes (Absorptive epithelial cells), les cellules à mucus (Goblet cells) et les cellules entéroendocrines (Entero-endocrine cells), qui migrent vers la villosité, et les cellules de Paneth (Paneth cells) maintenues dans la crypte.



Radtke et Clevers, *Science* 2005.

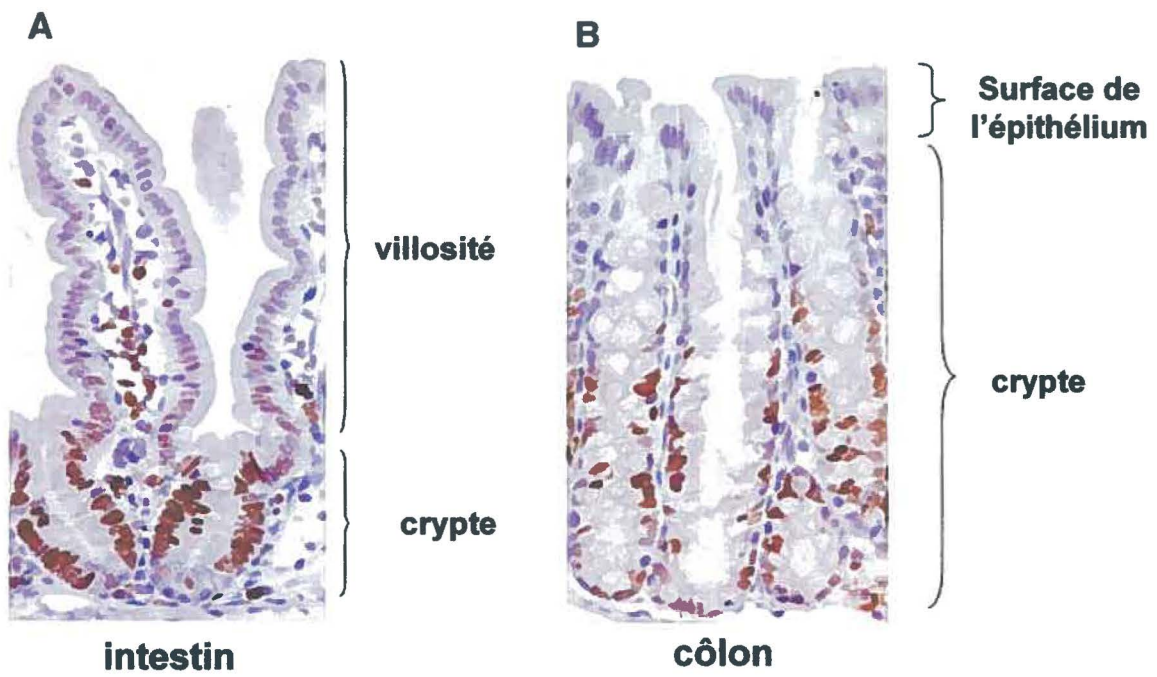
Figure 1

cellules différenciées vont se retrouver dans le tiers supérieur de la surface épithéliale (Fig. 2).

LE BUTYRATE

Une quantité phénoménale de microorganismes, soit plus de 100 trillions, réside à l'intérieur de l'intestin (Backhed *et al.*, 2005). Heureusement, la majorité de ces microorganismes ne sont pas pathogènes. Au contraire, la plupart d'entre eux jouent des rôles bien précis au niveau de la digestion. Par exemple, certains microorganismes vont permettre la production d'acides gras à la suite de la fermentation des fibres alimentaires retrouvées dans le tube digestif. Ces acides gras seront alors absorbés par les cellules intestinales épithéliales et vont constituer un apport énergétique important pour celles-ci (Cummings, 1984; Archer et Hodin, 1999). De plus, plusieurs études ont démontré que le butyrate, un acide gras à chaîne courte produit principalement dans le côlon, est essentiel pour le maintien de l'homéostasie au niveau de l'épithélium intestinal. Par exemple, le butyrate peut inhiber la croissance de tumeurs cancéreuses en induisant l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Medina *et al.*, 1997; Richon *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Butler *et al.*, 2000). Ces effets sont généralement associés à des changements au niveau de l'expression de différentes protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, dont p21Waf1/Cip1 (Archer et Hodin, 1999), différentes cyclines (Siavoshian *et al.*, 2000; Hinnebusch *et al.*, 2002), Bcl-2 et Bax (Hague *et al.*, 1997; Mandal *et al.*, 2001), en plus d'affecter l'expression de divers facteurs de transcription comme c-MYC (Souleimani et Asselin, 1993a) et c-FOS (Souleimani et Asselin, 1993b).

Figure 2. Comparaison entre l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon. Les cellules prolifératives de la crypte et de la villosité de l'intestin grêle (**A**) ainsi que les cellules prolifératives de la crypte et de la surface épithéliale du côlon (**B**) ont été marquées avec le marqueur de cycle cellulaire Ki67 (noyaux bruns).



Radtke et Clevers, *Science* 2005.

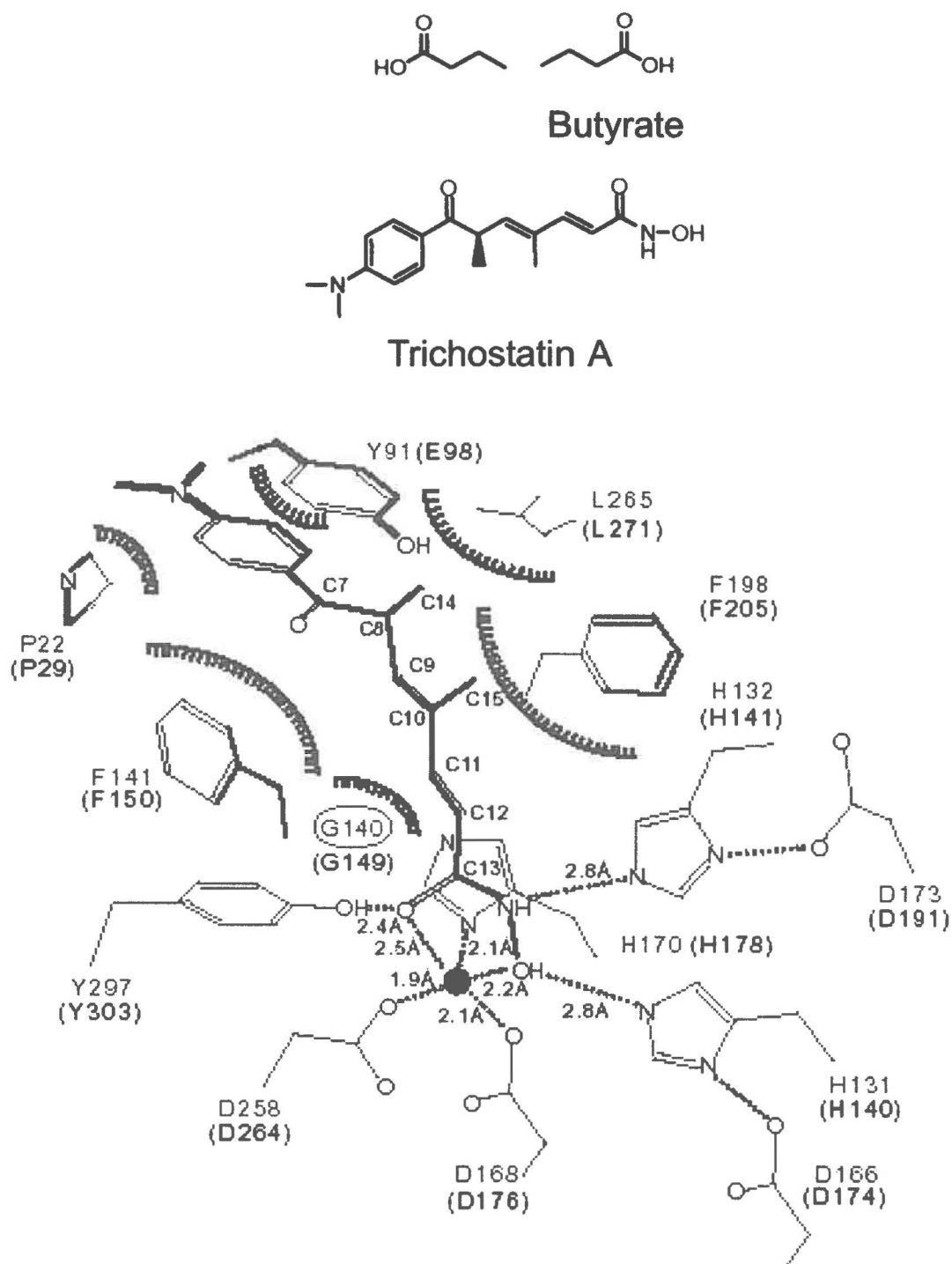
Figure 2

Le butyrate peut contrôler l'expression des gènes à différents niveaux, en modifiant les niveaux de transcription, la stabilité de l'ARNm et l'élongation (Ritzhaupt *et al.*, 1998; Heruth *et al.*, 1993; Archer et Hodin, 1999; Andoh *et al.*, 2002; Cuff *et al.*, 2002; Tong *et al.*, 2005,). Bien que les mécanismes moléculaires précis impliqués dans la régulation de l'expression des gènes par le butyrate demeurent plutôt vagues, certaines évidences ont démontré que le butyrate pouvait contrôler spécifiquement certaines voies de signalisation cellulaire (Yang *et al.*, 2001; McMillan *et al.*, 2003) et modifier les niveaux de méthylation de l'ADN (Boffa *et al.* 1994). Cependant, la majeure partie des effets du butyrate semble être plutôt reliée à sa capacité d'augmenter les niveaux d'acétylation cellulaire en inhibant les désacétylases.

L'INHIBITION DES DÉSACÉTYLASES

Plusieurs évidences ont démontré que la plupart des effets du butyrate sont reliés directement à sa capacité d'inhiber l'activité des désacétylases (HDAC). Bien que le mode d'action exact permettant au butyrate d'inhiber l'activité enzymatique des désacétylases ne soit pas connu, des études à l'aide d'inhibiteur de désacétylases Trichostatin A (TSA) ont démontré que l'inhibition des désacétylases se faisait via l'occupation par la molécule inhibitrice de la pochette catalytique des HDACs, bloquant ainsi leur activité (Fig. 3) (Davie, 2003). Puisque la structure de deux molécules de butyrate ressemble à celle d'une molécule de TSA, il a donc été suggéré que le butyrate pourrait inhiber l'activité des désacétylases de façon similaire.

Figure 3. Structure moléculaire du butyrate et du Trichostatin A, et inhibition des désacétylases. Représentation de l'interaction entre une molécule de Trichostatin A (noir) et un homologue HDAC chez la bactérie hyperthermophilie *Aquifex aeolicus* (HDLP, en gris). Les résidus similaires chez la désacétylase HDAC1 sont indiqués en noir.



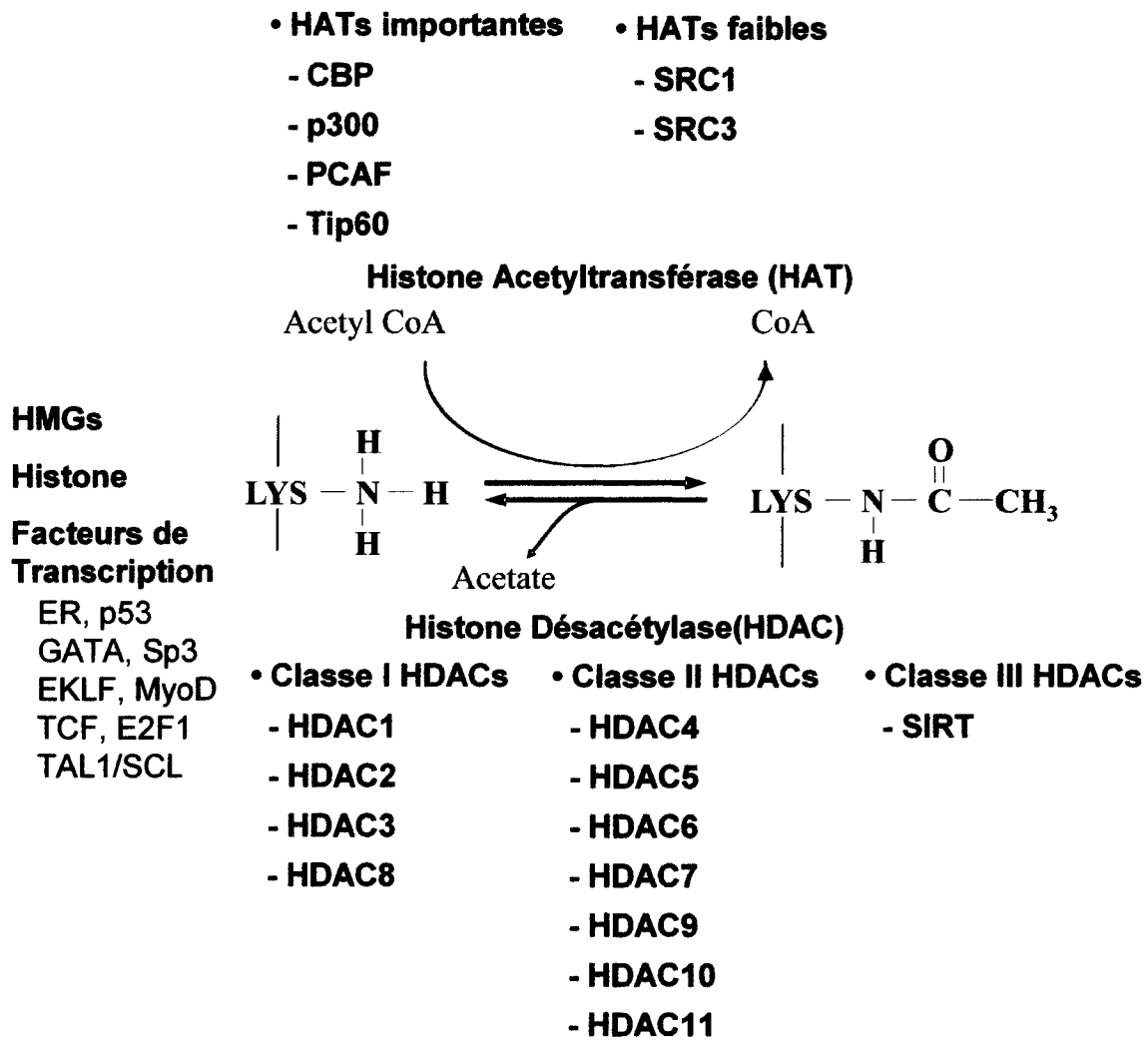
Davie, *Nut. Prot. Cancer Prev.*, 2003.

Figure 3

Jusqu'à maintenant, trois classes de HDAC ont été identifiées en fonction de leur homologie structurale. La classe I comprend les HDACs 1, 2, 3 et 8. Ces HDACs sont retrouvées principalement au niveau du noyau. La classe II comprend les HDACs 4, 5, 6, 7, 9, 10 et 11. Celles-ci sont retrouvées à la fois au niveau du noyau et du cytoplasme. La classe III possède un mécanisme enzymatique unique qui dépend directement de la présence d'un co-facteur, le NAD^+ . Contrairement aux deux premières classes, cette classe de HDAC n'est pas inhibée par le butyrate et le TSA (de Ruijter *et al.*, 2003). La plupart des HDACs de la classe I et II se retrouvent dans des complexes multi-protéiques nommés corépresseurs. Comme les HDACs ne possèdent pas d'activité de liaison à l'ADN, leur activité enzymatique est affectée principalement par la formation des complexes corépresseurs ainsi que toute interaction avec d'autres protéines. Également, des modifications post-transcriptionnelles, comme la phosphorylation et la sumoylation, peuvent affecter l'activité enzymatique de certaines HDACs. La localisation cellulaire, la dégradation par le protéasome ainsi que la régulation de l'expression des différentes HDACs sont également des mécanismes cellulaires pouvant affecter l'activité de ces enzymes (Sengupta et Seto, 2004).

L'inhibition des désacétylases par le butyrate exerce des effets importants dans la cellule, puisqu'une grande variété de facteurs peut être acétylés ou désacétylés (Fig. 4) (Davie, 2003). D'abord, les histones formant les nucléosomes de la chromatine peuvent être acétylées sur différentes lysines. L'inhibition des désacétylases par le butyrate permet donc d'augmenter de façon générale les niveaux d'acétylation sur les histones, et cette hyperacétylation de la chromatine est habituellement associée à une augmentation de

Figure 4. Acétylation par les histones acétyltransférases (HATs) et désacétylation par les histones désacétylases (HDACs).



Davie, *Nut. Prot. Cancer Prev.*, 2003.

Figure 4

l'activité transcriptionnelle (Cress et Seto, 2000). En fait, l'acétylation des histones provoque la modification de la structure de la chromatine en diminuant les interactions entre les histones et l'ADN, augmentant ainsi l'accessibilité de l'ADN à la machinerie transcriptionnelle. D'ailleurs, l'acétylation ainsi que d'autres modifications post-traductionnelles des histones dont la phosphorylation, l'ubiquitination et la méthylation, constituent ensemble le « Code Histone », qui propose que les différents patrons de modifications apportées sur les histones d'un nucléosome constituent de l'information épigénétique en régulant de façon précise l'accessibilité de l'ADN et donc le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Cosgrove et Wolberger, 2005). Aussi, l'inhibition des désacétylases peut augmenter les niveaux d'acétylation de divers facteurs de transcription et ainsi contrôler leur activité. Par exemple, l'acétylation de HMG, E2F1, p53, EKLF, GATA1 et HNF-4 affecte leur capacité de lier l'ADN, alors que l'acétylation de c-Jun, TCF, ACTR et HNF-4 modifie leur capacité d'interagir avec d'autres protéines (Polevoda et Sherman, 2002). L'acétylation de HNF-4 affecte également sa localisation nucléaire (Soutoglou *et al.*, 2000).

Malgré la quantité et la variété des facteurs affectés par l'inhibition des désacétylases, des études faites à l'aide de micropuces d'ADN ont démontré qu'uniquement 2 à 5% de l'expression génique est affectée par l'inhibition des désacétylases (Suzuki *et al.*, 2002; Della Ragione *et al.*, 2001). Ainsi, ceci suggère que le butyrate pourrait avoir un impact majeur sur de nombreux processus cellulaires en affectant uniquement l'expression d'un petit nombre de gènes.

L'INFLAMMATION INTESTINALE

Le butyrate est également considéré comme un agent protecteur contre l'inflammation au niveau de l'épithélium du côlon. En effet, une déficience en butyrate est souvent associée à diverses maladies inflammatoires intestinales (D'Argenio et Mazzacca, 1999; Topping et Clifton, 2001), et des traitements avec le butyrate semblent diminuer l'inflammation chez les patients atteints de colite ulcéreuse (Scheppach *et al.*, 1992; Steinhart *et al.*, 1994). De plus, dans les cellules épithéliales intestinales, les traitements avec le butyrate diminuent l'induction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-8 (Wu *et al.*, 1999), le facteur B (Andoh *et al.*, 1999), l'haptoglobine (Désilets *et al.*, 2000) et Cox-2 (Tong *et al.*, 2004). Bien que les mécanismes précis impliqués dans la régulation de l'expression des gènes de réponse inflammatoire ne soient pas connus, il a été proposé que le butyrate pourrait agir en tant qu'agent anti-inflammatoire en empêchant l'activation du facteur de transcription NF- κ B, comme démontré *in vivo* dans des modèles de colite chez la souris (Segain *et al.*, 2000; Venkatraman *et al.*, 2003) ainsi que dans les cellules de carcinome de côlon humain. En effet, un traitement avec le butyrate semble prévenir l'activation de NF- κ B par l'IL-1 β (Wu *et al.*, 1999; Luhrs *et al.*, 2001a) et le TNF α (Inan *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2001; Luhrs *et al.*, 2001b). Toutefois, il est important de noter que ces études ont vérifié l'activité de NF- κ B à la suite de traitements à long terme avec le butyrate, permettant donc l'implication d'effets indirects reliés aux nombreux changements cellulaires induits par l'inhibition des désacétylases. D'un autre côté, d'autres études ont démontré que l'addition de butyrate pouvait augmenter l'expression de la chemokine MIP-2 en réponse à l'IL-1 β (Ohno *et al.*, 1997) et celle du complément C3 en réponse au TNF α (Andoh *et al.*, 1999). Ainsi, le butyrate

semble pouvoir moduler l'expression des gènes de réponse inflammatoire de façon spécifique.

LES GÈNES SÉRUM AMYLOÏDE A2 (*SAA2*) ET INTERLEUKINE-8 (*IL-8*)

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales, comme la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, sont caractérisées par une augmentation importante de la production de protéines pro- et anti-inflammatoires, comme le sérum amyloïde A2 (*SAA2*) et l'interleukine 8 (*IL-8*) (Niederau *et al.*, 1997; MacDermott, 1999). La protéine *SAA2* fait partie de la famille de lipoprotéine *SAA*, dont 4 membres ont été identifiés chez l'humain (Uhlir et Whitehead, 1999). Induite exclusivement lors de l'inflammation et la phase aiguë de la réponse inflammatoire, l'expression de *SAA2* est entre autres contrôlée par différentes cytokines pro-inflammatoires, dont l'*IL-1β*, l'*IL-6* et le *TNFα*, agissant par les facteurs de transcription *NF-κB* et *C/EBP*. Lors de l'inflammation, *SAA2* semble contrôler l'agrégation des plaquettes, l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire, la détoxification des endotoxines et le métabolisme du cholestérol, suggérant un rôle autant au niveau pro-inflammatoire qu'au niveau anti-inflammatoire (Gabay et Kushner, 1999; Urieli-Shoval *et al.*, 2000). De plus, la protéine *SAA* peut également induire la production de *TNF-α*, d'*IL-1β* et d'*IL-8* par les neutrophiles chez l'humain (Furlaneto et Campa, 2000). Bien que *SAA2* soit principalement exprimée dans le foie, plusieurs évidences ont démontré que la protéine était également exprimée localement dans divers tissus, dont l'intestin. En effet, l'expression de *SAA2* est induite dans l'intestin de hamster lors de la phase aiguë de l'inflammation (Hardardottir *et al.*, 1997), chez les souris souffrant de colites induites par le dextran sulfate (Fukushima *et al.*, 2002), chez

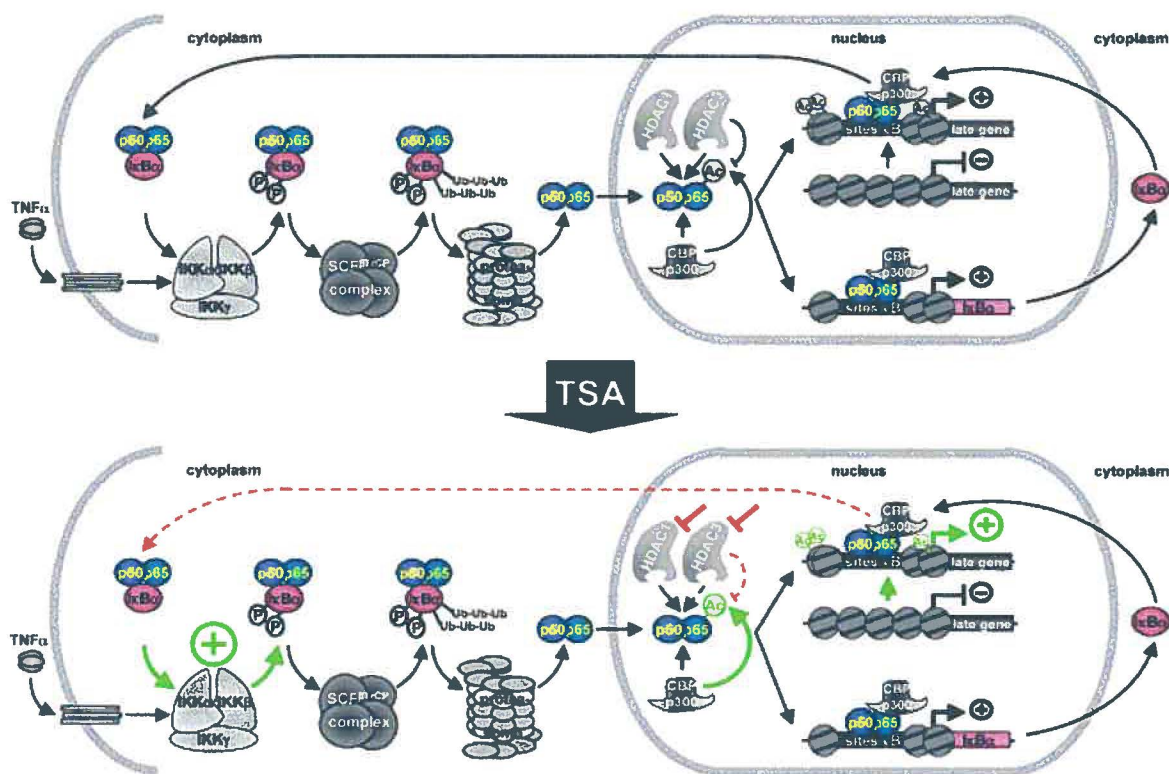
les souris déficientes pour l'IL-2 et souffrant de colites (de Villiers *et al.*, 2000) et dans plusieurs modèles cellulaires d'épithélium intestinal humain (Steel *et al.*, 1996; Vreugdenhil *et al.*, 1999).

L'IL-8 fait partie de la famille des cytokines chemotactiques regroupant plusieurs autres chemokines, dont RANTES, MCP-1/2/3, GRO et NAP-2. Tout comme SAA, l'IL-8 est impliquée dans la phase aiguë de la réponse inflammatoire (Feghali et Wright, 1997). En effet, sur les sites d'inflammation, cette chemokine est entre autres responsable de la stimulation des granulocytes, la migration chemotactique ainsi que de l'activation de différents types cellulaires dont les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes (Miller et Krangel, 1992). Cependant, dans les tissus sains, la présence d'IL-8 est à peine détectable. Lors d'une stimulation avec des cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-1 et le $\text{TNF}\alpha$, la sécrétion d'IL-8 peut être induite plus de 100 fois (Xie, 2001; Feghali et Wright, 1997). La régulation de l'expression de l'IL-8 semble être principalement contrôlée par la liaison au promoteur des facteurs de transcription AP-1, C/EBP et NF- κ B (Mukaida *et al.*, 1994). Plusieurs évidences ont également démontré que l'expression de ce gène pouvait être affectée par le butyrate (Fusunyan *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1997; Gibson *et al.*, 1999), mais les mécanismes entourant cette régulation sont plutôt vagues. Selon certaines évidences, cette régulation pourrait impliquer la modulation de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B par son association avec les désacétylases HDAC1 et HDAC2 (Ashburner *et al.*, 2001).

LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION NF- κ B ET C/EBP

Les C/EBPs et NF- κ B sont deux grandes familles de facteurs de transcription impliquées de façon importante dans la régulation de l'expression des gènes *SAA2* et *IL-8*. NF- κ B est exprimé de façon ubiquitaire et contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et la prolifération cellulaire (Ghosh et Karin, 2002). p50, p52, p65 (RelA), c-Rel et RelB sont les 5 sous-unités retrouvées chez les mammifères. Cependant, la forme de NF- κ B la plus fréquemment retrouvée est l'hétérodimère constitué des sous-unités p50 et p65. La régulation de l'activité de ce facteur de transcription se fait principalement via sa localisation cellulaire. En effet, dans les cellules non-stimulées, NF- κ B se retrouve principalement dans le cytoplasme, séquestré par la protéine inhibitrice I κ B. En présence d'un stimulus pro-inflammatoire ou d'un stress, l'induction des voies de signalisation permet l'activation de la kinase IKK qui phosphoryle alors la protéine inhibitrice I κ B, permettant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome 26S (Ben Neriah, 2002; Quivy et Van Lint, 2004). De cette façon, NF- κ B est libre de transloquer vers le noyau, où il pourra activer la transcription de deux classes de promoteurs, soit ceux dont l'accessibilité est immédiate (early genes) incluant celle de son inhibiteur I κ B, puis ceux dont la conformation doit être modifiée pour permettre la liaison de NF- κ B (late genes) (Fig. 5). Une fois synthétisé, I κ B peut recruter de nouveau NF- κ B au niveau du noyau et permettre son retour vers le cytoplasme. Plusieurs évidences ont démontré que la formation du complexe NF- κ B et I κ B dans le noyau dépendait directement de leur association avec certaines acétylases, dont CBP, p300, P/CAF et SRC-1/NcoA-1, et leur association avec les désacétylases, telles HDAC1, HDAC2 et HDAC3 (Quivy et Van Lint, 2004).

Figure 5. Modèle proposé pour la régulation de la voie de signalisation de NF- κ B par les désacétylases. Le TNF- α induit la phosphorylation de l'inhibiteur I κ B par le complexe IKK. I κ B est alors dégradé par le protéasome, permettant la nucléarisation de NF- κ B. Dans le noyau, NF- κ B active la transcription de gènes dont l'accessibilité est immédiate (early genes) incluant celle de son inhibiteur I κ B, puis la transcription des gènes dont la conformation doit être modifiée pour permettre la liaison de NF- κ B (late genes). I κ B nouvellement synthétisé pénètre dans le noyau et s'associe de nouveau à NF- κ B, déclenchant le retour du complexe dans le cytoplasme et donc l'arrêt de la transcription dépendante de NF- κ B. L'inhibition des désacétylases par le TSA va provoquer l'augmentation de l'activité de IKK, de l'acétylation de p65 et des histones sur les promoteurs initialement inaccessibles (en vert) et par conséquent la diminution de la désacétylation de p65, de son association avec I κ B et de son retour au cytoplasme (en rouge). Ainsi, l'inhibition des désacétylases pourrait permettre de prolonger l'expression des gènes exprimés tardivement (late genes).



Quivy et Van Lint, *Biochem. Pharmacol.* 2004.

Figure 5

Certaines études ont d'ailleurs démontré que l'inhibition des désacétylases par le butyrate ou le TSA pouvait contrôler directement l'activité de NF- κ B dans le noyau (Inan *et al.*, 2000; Luhrs *et al.*, 2001a; Luhrs *et al.*, 2001b; Ségain *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2001), en augmentant l'activation de IKK, l'acétylation de p65 et l'acétylation des histones sur les promoteurs initialement inaccessibles (late genes). Ainsi, l'inhibition des désacétylases permettrait d'empêcher la diminution de la désacétylation de p65, diminuant ainsi son association avec I κ B et empêchant son retour au cytoplasme (Fig. 5).

Les C/EBPs, ou CCAAT/enhancer-binding proteins, sont des facteurs de transcription de la classe leucine zipper exprimé dans un grand nombre de tissus, dont le foie, l'intestin, le côlon, les tissus adipeux, la peau et les glandes mammaires (McKnight, 2001). Cette famille de facteurs de transcription comprend 6 membres, allant de α à ζ , qui contiennent tous une région très homologue au niveau de la région C-terminale, composé d'un domaine basique de liaison à l'ADN et d'un leucine zipper. Pour lier l'ADN, les C/EBPs doivent former des dimères. Les C/EBPs sont impliqués dans plusieurs processus biologiques, dont la prolifération, la différenciation et le contrôle métabolique (Ramji et Foka, 2002). Aussi, les isoformes α , β et δ ont des rôles majeurs au niveau de la régulation de la réponse inflammatoire et leur activité ainsi que leur expression sont contrôlées par différentes cytokines et agents inflammatoires. Le rôle de ces trois isoformes au niveau de la régulation de l'expression des gènes de réponse inflammatoire semble bien distinct. Toutefois, certaines études ont démontré qu'il pourrait y avoir une certaine compensation de la part d'au moins un des deux autres isoformes en l'absence du troisième (Poli, 1998; Gheorghiu *et al.*, 2001). La régulation des isoformes C/EBP α ,

C/EBP β et C/EBP δ peut être effectuée à divers niveaux, dont leur transcription, leur traduction, leurs interactions entre elles ou avec d'autres protéines et leur phosphorylation (Ramji et Foka, 2002). Récemment, de nouvelles évidences ont démontré que l'activité des C/EBPs pouvait également être affectée par leur association avec des acétylases et des désacétylases (Kovács *et al.*, 2003; Erickson *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2003, Sotelis *et al.*, 2005), ou en présence d'inhibiteurs de désacétylases (Désilets *et al.*, 2001).

PRINCIPAUX OBJECTIFS DU PROJET

Les principaux objectifs de ce travail étaient d'identifier des cibles affectées par le butyrate lors de la réponse inflammatoire intestinale via l'inhibition des désacétylases, et de comprendre les mécanismes directement impliqués dans la régulation de l'expression des gènes de réponse inflammatoire par le butyrate dans les cellules intestinales épithéliales. Dans la première partie, nous utilisons la lignée cellulaire de carcinome de côlon humain Caco-2/15 à sous-confluence et à post-confluence afin d'étudier la régulation de deux gènes de réponse inflammatoire importants, soient *SAA2* et *IL-8*, par la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases (NaBu et TSA). Les cellules Caco-2/15 entament des processus de différenciation cellulaire dès l'atteinte de la confluence (Beaulieu et Quaroni, 1991), nous permettant donc de vérifier également l'effet de la différenciation cellulaire sur la régulation de l'expression des gènes de réponse inflammatoire par les inhibiteurs de désacétylases. Nos objectifs précis consistaient à vérifier l'effet des inhibiteurs de désacétylases sur l'induction par l'IL-1 β des gènes de réponse inflammatoire *SAA2* et *IL-8* dans les cellules sous-confluentes et post-confluentes, étudier la réversibilité de l'effet du butyrate et du TSA sur l'induction du gène *SAA2* par l'IL-1 β , déterminer l'effet de l'inhibition des désacétylases sur l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription C/EBP et NF- κ B et l'implication de ces facteurs de transcription au niveau de la régulation par les inhibiteurs de désacétylases de l'activité transcriptionnelle du promoteur *SAA2*, et finalement vérifier les modifications apportées sur les promoteurs *SAA2* et *IL-8* *in vivo* par l'IL-1 β et le butyrate.

En deuxième lieu, nos objectifs étaient de vérifier dans les cellules intestinales épithéliales humaines non-transformées HIEC-6 l'effet de l'inhibition des désacétylases par le butyrate sur les niveaux globaux d'acétylation des histones, sur l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription C/EBP et NF- κ B induits par l'IL-1 β , en plus de mesurer l'effet du butyrate sur la régulation de l'expression des gènes *SAA2* et *IL-8* par l'IL-1 β dans ces cellules. L'objectif final pour cette partie du travail était d'identifier à l'aide de micropuces à ADN les classes de gènes dont l'expression est affectée par le traitement des cellules HIEC-6 avec le butyrate, ainsi que de vérifier l'effet du butyrate sur l'induction des gènes impliqués lors de la réponse inflammatoire induite par l'IL-1 β .

Finalement, les objectifs de la troisième partie étaient de vérifier les niveaux d'acétylation cellulaire et l'expression des HDACs 1, 3, 4 et 6 dans les cellules non-différenciées ou différenciées, soit au niveau de l'axe crypte-villosité de l'intestin fœtal humain ou dans les cellules de carcinomes de côlon humain Caco-2/15. Nous avons également étudié le rôle de chacune des désacétylases sur l'expression des gènes de réponse inflammatoire *SAA2* et *IL-8* stimulée ou non par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Culture cellulaire

La lignée cellulaire de carcinome de côlon humain Caco-2/15 (Beaulieu et Quaroni, 1991) a été cultivée dans le milieu de croissance « Dulbecco's modified Eagle's medium » (DMEM) en présence de 10% de sérum bovin fœtal (FBS), 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Invitrogen, Burlington, ON). À l'atteinte de la confluence, les cellules Caco-2/15 se différencient et acquièrent les caractéristiques de cellules entérocytaires. Les cellules ont été recueillies à 30% confluence (sous-confluentes), à confluence (confluentes), 3 ou 15 jours après l'atteinte de la confluence (post-confluentes). Les cellules intestinales épithéliales humaines non-différenciées (HIEC-6) (Perreault et Beaulieu, 1996) ont également été cultivées dans le milieu DMEM additionné de 10% FBS, 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Invitrogen, Burlington, ON), dans lequel a été ajouté 10 µg/ml d'insuline (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON) et 5 ng/ml de EGF (R&D Systems, Minneapolis, MN). Les cellules Caco-2/15 et HIEC-6 ont été stimulées avec 10 ng/ml d'IL-1 β recombinant humain (R&D Systems, Minneapolis, MN), 5 mM de butyrate de sodium (NaBu) (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON), 1 µg/ml de Trichostatin A (TSA) (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON), seuls ou en combinaison.

Détection des modifications sur les histones

Les histones ont été extraites des cellules Caco-2 sous-confluentes et post-confluentes ainsi que des HIEC-6 stimulées pendant 1 à 24 heures avec les différents traitements. Après les traitements, les cellules ont été lavées deux fois avec une solution de PBS,

récoltées à l'aide d'un policeman et centrifugées 3 minutes à 1500 RPM. Les noyaux ont été isolés en lysant les cellules avec le tampon de lyse (10 mM HEPES pH 7.9, 1 mM EDTA, 60 mM KCl, 0.5 % NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). Après la centrifugation, les culots ont été suspendus dans 0.1 ml H_2SO_4 0.4 N et incubés pendant 2 heures à 4°C. Par la suite, les histones ont été précipitées à -20°C toute la nuit avec 1 ml d'acétone, pour finalement être suspendues dans le tampon Laemmli (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 1% mercaptoéthanol, 10% glycérol, 0.04% bleu de bromophénol). Les échantillons ont été soniqués sur glace 2 fois pendant 5 secondes (Ultrasonic Processor XL, Misonix Inc., Farmingdale, NY). Les histones ont été séparées par électrophorèse sur un gel SDS-polyacrylamide 15% et transférées sur une membrane PVDF (Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC). Les membranes ont été incubées dans une solution de blocage (TBS 1X, 0.05% Tween 20, 10% lait en poudre) pendant 2 heures à la température de la pièce, puis incubées à 4°C toute la nuit avec un anticorps polyclonal anti-lysine-acétylée purifié provenant de lapins (New England BioLabs, Mississauga, ON), dilué 1000 fois dans la solution de blocage. Par la suite, les membranes ont été lavées à la température de la pièce dans la solution de lavage (TBS 1X, 0.05% Tween 20) 3 fois pour une durée de 10 minutes, incubées à la température de la pièce pendant une heure avec l'anticorps secondaire anti-lapin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) dilué 1000 fois dans la solution de blocage, puis lavées à la température de la pièce 3 fois dans la solution de lavage pendant 10 minutes. Le complexe immunitaire a été détecté à l'aide du système de détection « Super Signal West Pico Substrate » (Pierce, Rockford, IL), selon les recommandations du manufacturier. La quantité totale de protéines sur les membranes a été évaluée par coloration au Rouge Ponceau.

Analyse par buvardage Northern

À la suite des différents traitements, les cellules Caco-2/15 et HIEC-6 ont été lavées 2 fois avec une solution de PBS, récoltées à l'aide d'un policeman et centrifugées 3 minutes à 1500 RPM. Les cellules ont été lysées avec 0.8 ml de TRIZOL pendant 5 minutes à la température de la pièce, puis 160 µl de chloroforme:alcool isoamylique 24:1 a été ajouté pendant 3 minutes à la température de la pièce. Les échantillons ont été centrifugés à 4°C pendant 15 minutes, puis la phase supérieure translucide a été récoltée. L'ARN cellulaire total a été précipité en ajoutant 500 µl d'isopropanol pendant 10 minutes à la température de la pièce, puis en centrifugeant pendant 10 minutes à 4°C. Le culot d'ARN a été lavé avec 1 ml d'éthanol 70%, puis suspendu dans 20 µl d'eau ultrapure. Pour chaque échantillon, 30 µg d'ARN recueilli ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant du tampon MOPS (0.01 M acide sulfonique 3-(N-Morpholino) propane sodium, 0.05 M EDTA, 48 mM acétate de sodium) et 2% de formaldéhyde. Les ARNs ont été transférés toute la nuit par capillarité sur membrane de nylon (Nytran, Schleicher & Schuell, Keene, NH) dans une solution de 10 X SSC (1.5 M chlorure de sodium, 150 mM citrate tri-sodique). Afin de fixer l'ARN, les membranes ont été déposées dans un four à 80°C pendant 2 heures puis traitées à l'UV deux minutes. La membrane a été humidifiée dans une solution 2 X SSC, puis incubée dans la solution de préhybridation (120 mM Tris-HCl pH 7.4, 600 mM NaCl, 8 mM EDTA, 0.1% pyrophosphate de sodium, 0.2% SDS, 0.01% héparine) de 2 à 3 heures à 65°C. La préhybridation a été suivie de l'hybridation toute la nuit à 65°C avec la sonde d'ADN préalablement marquée au [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (Multiprime kit, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC) diluée dans la solution d'hybridation (120 mM Tris-HCl pH 7.4, 600

mM NaCl, 8 mM EDTA, 0.1% pyrophosphate de sodium, 0.2% SDS, 0.06% héparine, 10% dextran sulfate) de façon à obtenir un compte de 200 à 500 CPS, puis chauffée à 95°C pendant 8 minutes. Les fragments d'ADN utilisés pour l'hybridation sont les suivants: le fragment sérum amyloïde A2 humain de 0.33 kilobase, amplifié par RT-PCR d'un échantillon d'ARN provenant d'un humain atteint de la maladie de Crohn avec les amorces d'oligonucléotides SAA +44 (5'-CTTCTCACGGGCCTGGTTTTTC-3') et SAA +374 (5'-AGTGATTGGGGTCTCTGCCAC-3'), le fragment IL-8 humain de 1.2 kilobase (Jobin C. *et al.*, 1999), le fragment C/EBP α humain de 0.686 kilobase amplifié par RT-PCR à partir d'ARN de cellules Caco-2/15 avec les amorces d'oligonucléotides C/EBP α +1450 (5'-GGAGAATTCTTGGGGCTGAGCTG-3') et C/EBP α +2136 (5'-GGAAGCTTGTCATAACTCCGGTC-3'), puis le fragment C/EBP δ humain de 0.718 kilobase amplifié par RT-PCR à partir d'ARN de cellules Caco-2/15 avec les amorces d'oligonucléotides C/EBP δ +260 (5'-CTGGAGCTGTGCCACGACGAGC-3') et C/EBP δ +978 (5'-CCTATGTCCCAAGAACTGCAGC-3'). Les niveaux d'ARN ont été confirmés par hybridation d'une sonde α -tubuline (Lemischka *et al.*, 1981). À la suite de l'hybridation, les membranes ont été lavées pendant 30 minutes à 65°C dans une solution de 0.1 X SSC et 0.1% SDS, puis les signaux ont été révélés en exposant les membranes sur film d'autoradiographie (Kodak BioMax MR Film, Mandel Scientific, Saint-Laurent, QC).

Gels de rétention

Les extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules HIEC-6, Caco-2/15 sous-confluentes, Caco-2/15 confluentes et Caco-2/15 3 jours post-confluentes traitées pendant

4 heures avec les différents traitements. Après les traitements, les cellules ont été lavées deux fois avec une solution de PBS, récoltées à l'aide d'un policeman et centrifugées 3 minutes à 1500 RPM. Les noyaux ont été isolés en lysant les cellules avec le tampon de lyse (10 mM HEPES pH 7.9, 1 mM EDTA, 60 mM KCl, 0.5 % NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). Après la centrifugation, le culot de noyaux a été suspendu dans le tampon NRB (nuclear resuspension buffer) (250 mM Tris pH 7.8, 75 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF), puis soumis à 3 séries de changements de température (2 minutes dans l'azote liquide, 2 minutes dans un bain à 37°C, vortex). Après une dernière centrifugation de 10 minutes à 4°C, le surnageant a été recueilli et conservé à -80°C. Pour le gel de rétention, les sondes ont été générées à partir des oligonucléotides sens et antisens correspondant au site de liaison à l'ADN de C/EBP présent dans le promoteur de l'haptoglobine de rat (Marinkovic et Baumann, 1990; Pelletier *et al.*, 1998) (-166 à -145, 5'-CCAAGTATGAAGCAAGAGCTCA-3') ainsi que le site consensus de liaison à l'ADN de NF- κ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'), sur lesquels a été ajouté aux extrémités 5' le nucléotide G. Les brins sens et antisens ont été hybridés à 95°C, refroidis lentement jusqu'à la température de la pièce, puis l'oligonucléotide double brin a été marqué au [α^{32} P]dCTP à l'aide du fragment Klenow de l'ADN polymérase I pendant 30 minutes à la température de la pièce. Pour l'essai, 10 μ g de protéines nucléaires ont été dilués dans un volume final contenant 1.5 μ l de tampon glycérol 10 X (0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.01 M DTT, 0.01 M EDTA, 50% glycérol), 1 μ l de 0.25 μ g/ μ l dIdC et 1 μ l de sonde radiomarkée (20-50 cps). Les essais Supershift ont été faits en incubant initialement les protéines nucléaires avec 1 μ l d'anticorps polyclonaux concentrés isolés de lapin, dirigés contre les protéines C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , NF-

κ B p50 et NF- κ B p65 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), pendant 30 minutes à la température de la pièce, suivi de l'ajout de la sonde radioactive pendant 30 minutes à la température de la pièce. Les complexes protéines-ADN ont été séparés par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide 5% contenant 2.25 ml de tampon TBE 10 X (0.89 M Tris, 0.89 M acide borique, 20 mM EDTA) et 2 ml de glycérol 50% pour un volume final de 45 ml, pendant 2 heures à 160 Volts dans le tampon de migration TBE 0.5 X. Les gels ont été séchés sur papier Whatman, puis les complexes ADN-protéines ont été révélés en exposant les gels sur film d'autoradiographie (Kodak BioMax MR Film, Mandel Scientific, Saint-Laurent, QC).

Mutations site-spécifiques du promoteur SAA2 humain

Une portion du promoteur SAA2 humain (-422 to +22) (Uhlir *et al.*, 1997) a été insérée dans le plasmide pGL3 basic contenant le gène rapporteur luciférase (Promega, Madison, WI). À l'aide de mutagenèse dirigée par « overlap » (Sambrook et Russell, 2001), des mutations spécifiques ont été introduites dans le promoteur SAA2 humain sur le site de liaison à l'ADN de C/EBP par introduction du site de restriction *AvrII* :

-195 à -163 : 5'-GTTCCCATAGGTTAC**CA**ACTGGGATAAATGAC-3'

5'-GTTCCCATAGGTTAC**CTAGG**TGGGATAAATGAC-3'

et sur le site de liaison à l'ADN de NF- κ B par introduction du site de restriction *PstI* :

-105 à -71 : 5'-AATGACCTGCAGGGAC**TTT**CCCCAGGGACCACATC-3'

5'-AATGACCTGCAGGGAC**TGCAG**CCAGGGACCACATC-3'

Les réactions PCR sur le vecteur pGL3-SAA2 ont été effectuées avec les oligonucléotides contenant les différentes mutations à l'aide de l'ADN polymérase Pfu

(Stratagene, La Jolla, CA). Le programme PCR débutait par 30 cycles de 94°C pour 1 minute, 55°C pour 1 minute, et 72°C pour 1 minute, et se terminait par un cycle final de 72°C pour 10 minutes. Afin de produire le promoteur SAA2 de 444 pb, une nouvelle réaction PCR a été faite sur les produits PCR mutants obtenus précédemment en utilisant les oligonucléotides correspondants aux parties terminales :

-422: 5'-CCAGCGGATAGAATGGCGCCGGGCCTTTCTTTATG-3'

+22: 5'-GGTACCGAGCTCACAGGGATTTTCAGTCAGGGTCAT-3'

L'ADN polymérase Pfu a également été utilisée pour cette réaction et l'amplification PCR était constituée de 30 cycles de 94°C pour 1 minute, 55°C pour 1 minute, et 72°C pour 1 minute, puis un cycle final de 72°C pour 10 minutes. Les fragments d'ADN amplifiés ont été digérés par enzymes de restriction, isolés sur gel et purifiés par phénol/chloroforme, réintroduits dans le vecteur pGL3 basic, puis séquencés (University Core DNA & Protein Services, University of Calgary, Calgary, AB) afin de confirmer l'intégration des mutations dans le promoteur SAA2.

Transfections transitoires et essais luciférase

Les cellules HIEC-6, Caco-2/15 sous-confluentes et Caco-2/15 3 jours post-confluentes ont été cultivées dans des plaques de 24 puits et transfectées avec les vecteurs luciférase contenant le promoteur SAA2 normal ou muté pour les sites de liaison à l'ADN de C/EBP ou NF- κ B, de même que celui contenant le promoteur IL-8 (-135 to +46) (Wu *et al.*, 1997), avec ou sans les vecteurs d'expression HDAC1, HDAC3, HDAC4 et HDAC6 (Yang XJ, Université McGill, Montréal, QC). Pour chaque puits, 0.1 μ g d'ADN dilué dans 50 μ l d'OptiMEM (Invitrogen, Burlington, ON) a été incubé pendant 20 minutes à

la température de la pièce avec 1 μ l de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON) dilué dans 50 μ l d'OptiMEM, puis la réaction a été ajoutée dans chaque puit respectif pendant 24 heures. Pour les inductions, les cellules ont été traitées de 8 à 24 heures additionnelles avec l'IL-1 β , le NaBu et le TSA, seuls ou en combinaison. Les cellules ont par la suite été lysées avec 300 μ l de tampon de lyse (25 mM glycylglycine, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM DTT), puis l'activité luciférase a été évaluée avec un luminomètre (MiniLumat LB 9506, EG&G Berthold, Bundoora, Australia) en ajoutant 100 μ l du tampon de réaction (25 mM glycylglycine, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 15 mM K₂HPO₄, 6 mM ATP, 3 mM DTT, pH 7.6) et 100 μ l de luciférine (25 mM glycylglycine, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 1 mM luciférine). Les résultats montrés sont représentatifs des données obtenues en quadruplicata à au moins trois reprises. La différence entre les inductions mesurées a été analysée à l'aide du t-test de student et considérée significative lorsque $p \leq 0.05$.

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Les essais d'immunoprécipitation de la chromatine ont été effectués en suivant le protocole du « Chromatin Immunoprecipitation (CHIP) assay kit » (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). L'IL-1 β et le NaBu, seuls ou en combinaison, ont été ajoutés dans 5 ml de milieu DMEM additionné 10% FBS contenu dans les pétris de 100 mm de Caco-2/15 sous-confluentes (50% confluentes) pendant 4 heures. Les cellules ont ensuite été traitées avec 1% de formaldéhyde (135 μ l de formaldéhyde 37% par pétri de 100 mm) pour 10 minutes à 37 °C. Les cellules ont été lavées 2 fois avec 3 ml de PBS froid contenant des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml

pepstatin A), grattées avec un policeman dans 1 ml de la solution de PBS froid, recueillies dans un tube conique de 15 ml et centrifugées à 2000 RPM 4 minutes à 4°C. Le culot a été suspendu dans 200 µl de la solution SDS Lysis Buffer (catalogue #20-163), préchauffée à la température de la pièce et à laquelle ont été ajoutés les inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin A), et incubé 10 minutes sur glace. Les échantillons ont été soniqués sur glace 3 fois pendant 10 secondes à 30% (Ultrasonic Processor XL, Misonix Inc., Farmingdale, NY), centrifugés à 13000 RPM pendant 10 minutes à 4°C, puis le surnageant a été dilué 10 fois (200 µl de surnageant dans 1.8 ml) dans le ChIP Dilution Buffer (catalogue #20-153) additionné des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin A). 20 µl de la dilution ont été conservés pour l'évaluation des niveaux d'ADN initiaux. Afin d'éliminer la liaison non-spécifique avec la protéine A Agarose, les échantillons ont été incubés avec 80 µl de Salmon Sperm DNA/Protein A Agarose-50% Slurry (catalogue #16-157C) avec agitation pendant 30 minutes à 4°C, puis centrifugés 1 minute à 1000 RPM. Le surnageant a été recueilli, puis la chromatine liée aux protéines d'intérêt a été immunoprécipitée en ajoutant 5 µl d'anticorps polyclonaux de lapin contre l'histone H3 acétylée et l'histone H4 acétylée (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), ou contre C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , NF- κ B p50 et NF- κ B p65 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Les échantillons ont été incubés toute la nuit à 4°C avec agitation. Le lendemain, 60 µl de Salmon Sperm DNA/Protein A Agarose-50% Slurry (catalogue #16-157C) ont été ajoutés aux échantillons, suivi d'une incubation pendant une heure à 4°C avec agitation, afin d'amasser les complexes ADN-protéines-anticorps. Les culots d'agarose ont été précipités par centrifugation de 1 minute à 1000 RPM à 4°C, puis lavés

avec agitation une fois pendant 5 minutes avec 1 ml de Low Salt Immune Complex Wash Buffer (catalogue #20-154), une fois pendant 5 minutes avec 1 ml de High Salt Immune Complex Wash Buffer (catalogue #20-155), une fois pendant 5 minutes avec 1 ml de LiCl Immune Complex Wash Buffer (catalogue #20-156), puis 2 fois pendant 5 minutes avec 1 ml de 1X TE (catalogue #20-157). Les complexes ont alors été élués en ajoutant 250 µl de tampon d'éluion fait extemporanément (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃), vortexant quelques secondes et incubant avec agitation à la température de la pièce pendant 15 minutes. Les échantillons ont été centrifugés, le surnageant conservé, et 250 µl de tampon d'éluion a été ajouté aux billes une deuxième fois pendant 15 minutes avec agitation. Le deuxième surnageant a été additionné au premier (volume total : 500 µl), 20 µl de NaCl 5 M (catalogue #20-159) ont été ajoutés, puis les liens entre l'ADN et les protéines ont été défaits en incubant à 65°C pendant 4 heures. Afin d'éliminer les protéines, 10 µl de 0.5 M EDTA (catalogue #20-158), 20 µl de 1 M Tris-HCl pH 6.5 (catalogue #20-160) et 2 µl de 10 mg/ml de Protéinase K ont été ajoutés, puis les échantillons ont été incubés pendant une heure à 45°C. L'ADN a été récupéré par extraction phénol/chloroforme, en ajoutant 20 µg de glycogène pour pouvoir visualiser les culots. Les culots ont été suspendus dans 50 µl d'eau ultra-pure, puis 1 µl a été utilisé pour chaque réaction PCR dans un volume final de 25 µl. Les promoteurs SAA2 et IL-8 humains ont été amplifiés par PCR à l'aide du "Taq PCR Master Mix Kit" (Qiagen, Mississauga, ON) avec les amorces suivantes:

SAA 2 (-215 à -33) :	SAA2 5' (-215 à -197):	5'-GGCACAGCAAACCTCTCTT-3'
	SAA2 3' (-51 à -33):	5'-GTGAGCCTTGCTGGTCTCT-3'
IL-8 (-121 à +61):	IL-8 5' (-121 à -103):	5'-GGGCCATCAGTTGCAAATC-3'
	IL-8 3' (+42 à +61):	5'-TTCCTTCCGGTGGTTTCTTC-3'

Le programme PCR utilisé pour l'amplification débutait par un premier cycle de 94°C pour 5 minutes (hot start), suivi par 25 à 30 cycles de 94°C pour 1 minute, 55°C pour 1 minute, et 72°C pour 1 minute, et se terminait par un cycle final de 72°C pour 10 minutes. Le nombre de cycles a été sélectionné en fonction de la phase linéaire de l'amplification. 20 µl de l'ADN amplifié ont été séparés et visualisés sur gel d'agarose 1.5% contenant du bromure d'éthidium. Chaque expérience a été répétée à trois reprises de façon indépendante.

Analyse par micropuces d'ADN

Les cellules HIEC-6 ont été traitées avec l'IL-1 β et le NaBu, seuls ou en combinaison, pendant 8 heures. L'ARN cellulaire total a été extrait avec le TRIZOL (Invitrogen, Burlington, ON). Pour l'analyse par micropuces d'ADN, 10 µg de l'ARN extrait ont été utilisés pour la synthèse de l'ADN complémentaire, suivi de la réverse transcription *in vitro* pour créer de l'ADNc marqué à la biotine à l'aide d'une amorce du promoteur T7 possédant une queue poly(T). L'ADNc a été alors hybridé sur une micropuce « Human Genome U133 Plus 2.0 Array » (Affymetrix, CA) contenant les oligonucléotides correspondants à la totalité du « Human Genome U133 Set » ainsi que de 6,500 gènes additionnels pour atteindre un nombre de gènes final à analyser de plus de 47,000 transcrits. L'ADNc cible a été alors coloré à la streptavidine-phycoérythrine, suivi de l'analyse des micropuces à l'aide du module de criblage GeneArray à une longueur d'onde de 488 nm. L'analyse des données, de la moyenne, des différences et de l'expression de chaque élément présent sur les micropuces a été obtenue à l'aide du programme « Affymetrix Microarray Suite 5.0 (MAS5)» avec les différents paramètres

établis (Plate-forme de micropuces à ADN, Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill). La classification des gènes selon les processus cellulaires dans lesquels ils sont impliqués a été produite à l'aide du programme 'Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)' (<http://apps1.niaid.nih.gov/david/>).

Analyse par RT-PCR

L'ARN total des cellules HIEC-6 a été extrait 8 heures après le début des différentes inductions à l'aide du TRIZOL (Invitrogen, Burlington, ON). L'ADN complémentaire a été synthétisé en utilisant le système "oligo(dT) Superscript II RT" (Invitrogen, Burlington, ON), suivant les instructions du fabricant, puis amplifié par PCR à l'aide du "Taq PCR Master Mix Kit" (Qiagen, Mississauga, ON). Afin de générer des produits de PCR de taille variant de 400 à 600 pb correspondant aux gènes humains sélectionnés, les amorces suivantes ont été utilisées :

IL-1α (NM_000575) :	IL-1 α +2306 (5'-AATCAGG GAGGTCATTTTGG-3') IL-1 α +2721 (5'-TGATTGCAGGTGGAATTGAA-3')
IL-1β (NM_00576) :	IL-1 β +641 (5'-CTGTCCTGCGTG TTGAAAGA-3') IL-1 β +1224 (5'-AGAATGTGGGAGCGAATGAC-3')
IL-6 (NM_000600) :	IL-6 +307 (5'-AAAGAGGCACTGGCAGAAAA-3') IL-6 +714 (5'-GAGGTGCCCATGCTACATTT-3')
CXCL2 (NM_002089) :	CXCL2 +445 (5'-CCCTGCCTTACAGGAACAGA-3') CXCL2 +849 (5'-ATACATTTCCCTGCCGTCAC-3')
CXCL5 (NM_002994) :	CXCL5 +1777 (5'-TTCAGTGGGATTTTGAAG CA-3') CXCL5 +2301 (5'-GGCATCTAAAAAGCTCAGCAA-3')
CXCL11 (NM_005409) :	CXCL11 +605 (5'-CCCAAAGGAGTCCAGCAAT-3') CXCL11 +1141 (5'-AAATTAAGACCGGT GCTGCT-3')

CCL20 (NM_004591) : CCL20 +148 (5'-GCAAGCAACTTTGACTGCTG-3')
CCL20 +698 (5'-TGCTTGCAAGAAAGTCCATA-3')

CSF2 (NM_000758) : CSF2 +128 (5'-ATGTGAATGCCATCCAGG AG-3')
CSF2 +636 (5'-CTTCTGCCATGCCTGTATCA-3')

C3 (NM_000064) : C3 +4484 (5'-GGAGCAGTCAAGGTCTACGC-3)
C3 +5005 (5'-GTCCTGGCATTGTTTCTGGT-3').

Les amorces ont été élaborées avec le programme Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) développé par le « Whitehead Institute for Biomedical Research ». Le programme PCR utilisé pour l'amplification débutait par un premier cycle de 94°C pour 5 minutes (hot start), suivi par 21 à 25 cycles de 94°C pour 1 minute, 55°C pour 1 minute, et 72°C pour 1 minute, et se terminait par un cycle final de 72°C pour 10 minutes. Le nombre de cycles a été sélectionné en fonction de la phase linéaire de l'amplification. La quantité d'ADN complémentaire utilisé pour chaque extrait a été évaluée par amplification de l'ARNm de glyceraldéhyde-3 phosphate-deshydrogénase (GAPDH) avec les amorces GAPDH +3 (5'-CCAAAGTTGTCATGGATGAC-3') et GAPDH +499 (5'-GTGAAGGTCGGTGTGAACGG-3'). Les produits PCR amplifiés ont été séparés sur gel d'agarose 1% et visualisés par coloration au bromure d'éthidium. La quantification des produits PCR a été effectuée avec le programme ImageQuant (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC) et les données ont été normalisées avec le contrôle GAPDH.

Immunofluorescence indirecte

Les tissus de jéjunum humain ont été extraits à partir de fœtus âgés entre 18 et 20 semaines de gestation, provenant de terminaison de grossesses normales contrôlée. Aucun tissu provenant de cas connu de malformation ou de mort foetale n'a été

sélectionné. Les techniques utilisées ont été approuvées par un comité de révision des projets sur les sujets humains. Brièvement, les segments de jéjunum humain ont été rincés dans une solution de NaCl 0.15 M, sectionnés en petits fragments de 2 à 3 μm , immergés dans un composé de température de coupe optimale (optimum cutting temperature compound, OCT), puis rapidement congelés dans l'azote liquide (Deschenes *et al.*, 2001). Les sections congelées ont été par la suite étalées sur une lame de verre recouverte de silane, puis séchées à température de la pièce pour 1 heure, avant d'être entreposées à -80°C . Une solution de 2% formaldéhyde dilué dans du PBS (pH 7.4; 45 min, 4°C) a été utilisée pour la fixation des sections avant l'immunofluorescence indirecte. Ensuite, les lames ont été lavées 3 fois pendant 5 minutes avec du PBS, puis incubées pendant 45 minutes à 4°C dans une solution de glycine (100 mM glycine dans du PBS). Après 3 lavages de 5 minutes dans du PBS, les lames ont été incubées pendant 30 minutes dans une solution de blocage (10% lait en poudre dans du PBS). Les lames ont alors été rincées 2 fois avec du PBS puis incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps polyclonaux purifiés anti-lysine-acétylée, anti-HDAC1, anti-HDAC3, anti-HDAC4 et anti-HDAC6 (New England BioLabs, Mississauga, ON) provenant de lapins, dilués 1:50 (lysine-acétylée) et 1:25 (HDAC1, HDAC3, HDAC4 et HDAC6) dans le lait (5% lait en poudre dans du PBS). Aucun anticorps primaire n'a été ajouté pour les contrôles négatifs. Le lendemain, 3 lavages de 5 minutes au PBS ont été faits avant d'incuber les lames avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (Roche Diagnostics Canada, Laval, QC) dilué 1:50 dans le lait (5% lait en poudre dans du PBS) pendant 30 minutes à la température de la pièce. Les lames ont été lavées une dernière fois avec du PBS pendant 5 minutes avant la

détection de la fluorescence effectuée par microscopie à fluorescence (LEICA DM RXA, Meyer Instruments Inc., TX).

Analyse par buvardage Western

Les extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules Caco-2/15 sous-confluentes et 3 jours post-confluentes. Après les traitements, les cellules ont été lavées deux fois avec une solution de PBS, récoltées à l'aide d'un policeman et centrifugées 3 minutes à 1500 RPM. Les noyaux ont été isolés en lysant les cellules avec le tampon de lyse (10 mM HEPES pH 7.9, 1 mM EDTA, 60 mM KCL, 0.5 % NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). Après la centrifugation, les culots ont été suspendus dans le tampon Laemmli (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 1% mercaptoéthanol, 10% glycérol, 0.04% bleu de bromophénol). Les échantillons ont été soniqués sur glace 2 fois pendant 5 secondes (Ultrasonic Processor XL, Misonix Inc., Farmingdale, NY), puis les protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel SDS-polyacrylamide 8% (HDAC4 et HDAC6) ou 10% (HDAC1 et HDAC3) et transférées sur une membrane PVDF (Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC). Les membranes ont été incubées dans une solution de blocage (TBS 1X, 0.05% Tween 20, 10% lait en poudre) pendant 2 heures à la température de la pièce, puis incubées à 4°C toute la nuit avec les anticorps polyclonaux purifiés de lapin anti-HDAC1, anti-HDAC3, anti-HDAC4, anti-HDAC6 (New England BioLabs, Mississauga, ON) dilués 1000 fois dans la solution de blocage. Par la suite, les membranes ont été lavées à la température de la pièce dans la solution de lavage (TBS 1X, 0.05% Tween 20) 3 fois pour une durée de 10 minutes, incubées à la température de la pièce pendant une heure avec l'anticorps secondaire anti-lapin (Santa Cruz

Biotechnology, Santa Cruz, CA) dilué 1000 fois dans la solution de blocage, puis lavées à la température de la pièce 3 fois dans la solution de lavage pendant 10 minutes. La quantité de protéines sur les membranes a été évaluée par hybridation avec l'anticorps polyclonal purifié de lapin anti-lamineB (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Le complexe immun a été détecté à l'aide du système de détection « Super Signal West Pico Substrate» (Pierce, Rockford, IL) selon les recommandations du manufacturier.

RÉSULTATS

1. Mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression des gènes de réponse inflammatoire *SAA2* et *IL-8* par les inhibiteurs de désacétylases dans les cellules de carcinome de côlon humain Caco-2/15

*1.1. L'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases induisent de façon synergique l'expression du gène de réponse inflammatoire *SAA2* et permettent le maintien des niveaux d'expression de l'*IL-8* à court terme.*

Nous avons d'abord voulu déterminer l'effet des inhibiteurs de désacétylases sur l'induction de l'expression du gène codant pour la sérum amyloïde A2 (*SAA2*) en comparaison de l'induction du gène codant pour l'interleukine-8 (*IL-8*), par la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β . Les cellules ont été traitées avec l'IL-1 β , le NaBu et le TSA, seuls ou en combinaison, de façon simultanée afin d'éviter d'induire des effets indirects sur l'expression génique causés par un traitement prolongé avec les inhibiteurs de désacétylases (non-montré). Aucun niveau d'expression de *SAA2* ou d'*IL-8* n'a été détecté dans les cellules Caco-2/15 sous-confluentes et post-confluentes traitées avec le NaBu ou le TSA seuls, comme démontré par buvardage Northern (non-montré). Le traitement des cellules Caco-2/15 sous-confluentes n'a pas permis d'induire l'expression du gène *SAA2*, alors que 2 heures de traitement avec l'IL-1 β a suffi pour induire les niveaux d'ARNm de *SAA2* dans les cellules Caco-2/15 3 jours et 15 jours post-confluentes (Fig. 6 et non-montré), suivi d'une diminution des niveaux d'expression de *SAA2* après 24 heures d'induction (Fig. 6). Le traitement des cellules sous-confluentes avec une combinaison de l'IL-1 β et de l'un ou l'autre des inhibiteurs de désacétylases a permis une induction synergique de l'expression de *SAA2* après 8 heures de traitement,

Figure 6. Effet des inhibiteurs de désacétylases sur l'induction de l'expression des gènes de réponse inflammatoire SAA2 et IL-8 par l'IL-1 β . L'ARN total des cellules Caco-2/15 sous-confluentes (S-C) et 3 jours post-confluentes (P-C) a été isolé à la suite de traitements de 2, 4, 8 ou 24 heures avec l'IL-1 β (10 ng/ml), la combinaison d'IL-1 β avec le butyrate (NaBu, 5 mM) ou la combinaison d'IL-1 β avec le Trichostatin A (TSA, 1 μ g/ml). Le buvardage Northern a été effectué avec les sondes SAA2 et IL-8 radiomarquées au [α^{32} P]dCTP, et les niveaux d'ARN ont été vérifiés à la suite de l'hybridation avec la sonde α -tubuline.

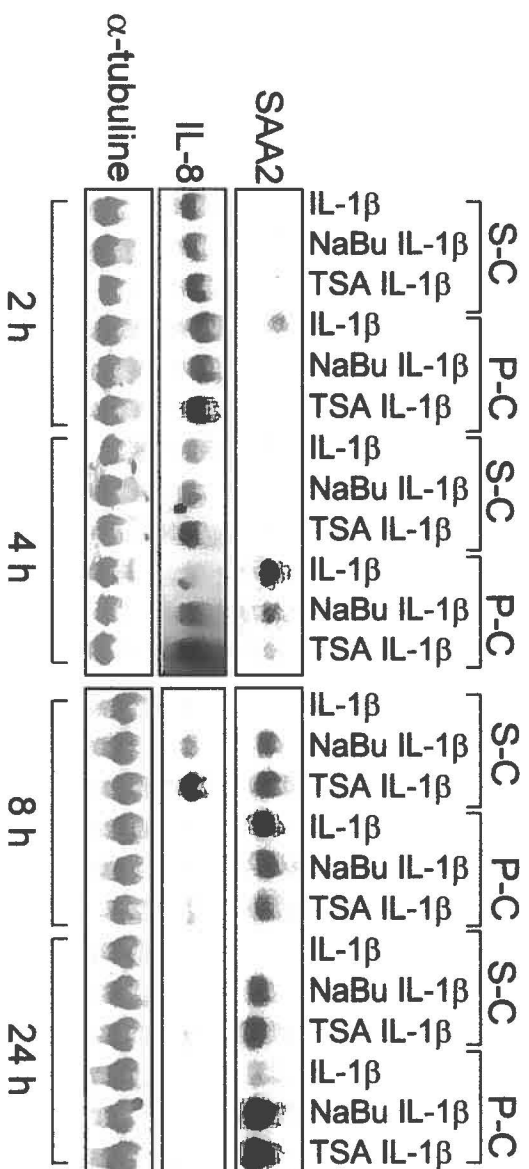


Figure 6

et de hauts niveaux d'ARNm de SAA2 étaient toujours présents après 24 heures de traitement. Une induction biphasique de SAA2 a été observée dans les cellules post-confluentes en réponse à la combinaison de l'IL-1 β et du NaBu ou du TSA, avec une répression initiale par l'ajout d'inhibiteurs de désacétylases, suivi d'une induction synergique des niveaux d'ARNm de SAA2 après 24 heures, semblable à celle observée dans les cellules Caco-2/15 sous-confluentes.

Le traitement des cellules Caco-2/15 sous-confluentes ou post-confluentes pendant 2 heures avec l'IL-1 β a suffi pour induire les niveaux d'expression de l'*IL-8*. L'ajout d'inhibiteurs de désacétylases n'a pas affecté l'induction initiale de l'expression d'*IL-8* mais a permis le maintien des niveaux d'expression à plus long terme. En effet, les niveaux d'*IL-8* induits par l'IL-1 β ont été diminués dès 4 heures après le traitement en l'absence d'inhibiteurs de désacétylases, mais ont été maintenus de 4 à 8 heures suivant l'induction dans les cellules traitées avec la combinaison d'IL-1 β et de NaBu ou de TSA. Ces résultats montrent donc que la cinétique d'induction de l'*IL-8* est différente de celle de *SAA2*, et que l'induction synergique de l'expression du gène *SAA2* par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases est spécifique.

L'activité transcriptionnelle du promoteur SAA2 a également été augmentée de façon synergique dans les cellules Caco-2/15 sous-confluentes et 3 jours post-confluentes traitées pendant 8 heures ou 24 heures avec l'IL-1 β et l'un ou l'autre des inhibiteurs de désacétylases, comme démontré par transfections transitoires et essais luciférase (Fig. 7). Dans les cellules sous-confluentes, l'induction de l'activité transcriptionnelle du

Figure 7. Régulation de l'activité transcriptionnelle des promoteurs SAA2 et IL-8 par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases. Les cellules Caco-2/15 sous-confluentes (S-C) **(A)** et 3 jours post-confluentes (P-C) **(B)** ont été transfectées transitoirement avec les constructions SAA2-luc et IL-8luc, puis traitées pendant 8 ou 24 heures avec l'IL-1 β (10 ng/ml), avec et sans NaBu (5 mM) ou TSA (1 μ g/ml). Les niveaux d'induction ont été déterminés par comparaison avec ceux des cellules non-traitées. Les barres d'erreur ont été évaluées en fonction de la déviation standard de quatre expériences indépendantes représentatives effectuées en triplicata.

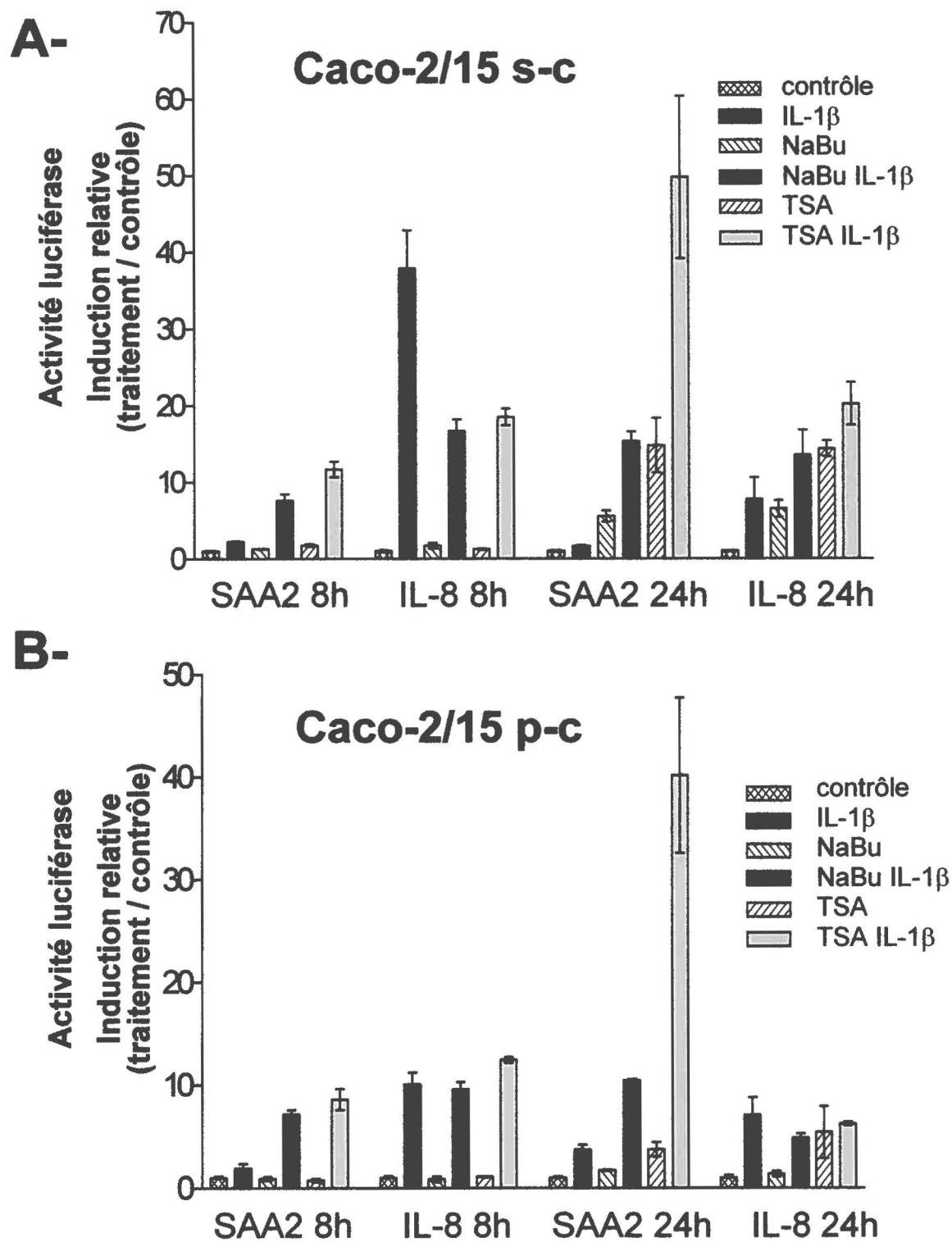


Figure 7

promoteur de l'IL-8 après 8 heures de traitement avec l'IL-1 β était diminuée en présence d'inhibiteurs de désacétylases, alors que les niveaux d'induction étaient plutôt maintenus en présence d'inhibiteurs de désacétylases après 24 heures. Dans les cellules post-confluentes, les inhibiteurs de désacétylases n'ont pas affecté significativement l'induction par l'IL-1 β de l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'IL-8.

Ces résultats démontrent que les inhibiteurs de désacétylases induisent au niveau transcriptionnel l'expression du gène *SAA2* de façon synergique en présence d'IL-1 β , mais permettent uniquement le maintien des niveaux d'expression de l'IL-8 induits par l'IL-1 β . La régulation des gènes de réponse inflammatoire *SAA2* et *IL-8* par les inhibiteurs de désacétylases est donc spécifique et dépend du contexte cellulaire.

1.2. Un traitement transitoire avec l'IL-1 β ou les inhibiteurs de désacétylases suffit pour enclencher l'induction de l'expression de SAA2.

Il a déjà été démontré, entre autres dans notre laboratoire, qu'un traitement prolongé avec des inhibiteurs de désacétylases pouvait modifier toute une panoplie de processus cellulaires. Certaines de ces modifications sont des conséquences directes de l'action des inhibiteurs de désacétylases, tandis que d'autres sont plutôt le fruit d'un effet indirect. Dans notre étude, les résultats semblent démontrer que les inhibiteurs de désacétylases régulent de façon spécifique l'expression du gène *SAA2* et que leur action à court terme peut affecter l'expression du gène à long terme, possiblement en engendrant des modifications spécifiques. Plusieurs études ont démontré que l'induction des niveaux globaux d'acétylation des histones par le butyrate et le TSA était réversible, suggérant

ainsi la réversibilité de l'effet global de ces inhibiteurs de désacétylases sur l'expression génique (McKnight *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1995; Mariani *et al.*, 2003). Nous avons donc voulu vérifier si la réversibilité de l'induction des niveaux globaux d'acétylation des histones par les inhibiteurs de désacétylases pouvait affecter la régulation de l'expression du gène SAA2. Nous avons d'abord évalué la réversibilité de l'acétylation sur les histones après avoir enlevé les inhibiteurs de désacétylases du milieu de culture des cellules Caco-2/15 sous-confluentes. Les cellules ont donc été traitées pendant différents temps avec le NaBu (Fig. 8A) ou le TSA (Fig. 8B), puis lavées à plusieurs reprises avec du PBS avant d'être remises dans le milieu de culture sans inhibiteurs de désacétylases pour une période de 12 heures, pour finalement procéder à l'extraction des histones. Les niveaux globaux d'acétylation sur les histones ont alors été mesurés par buvardage Western à l'aide d'un anticorps anti-lysine-acétylée. Les résultats obtenus ont démontré que les niveaux globaux d'acétylation sur les histones H3 et H4 sont réduits 12 heures après le retrait du NaBu ou du TSA, peu importe la longueur du traitement initial. Afin de déterminer plus précisément la durée de la réversibilité de l'acétylation, nous avons refait l'expérience en incubant initialement les cellules sous-confluentes Caco-2/15 avec le NaBu ou le TSA pour 12 heures, et en recueillant les extraits d'histones de 30 minutes à 8 heures suivant le retrait des inhibiteurs de désacétylases du milieu de culture. Dans les cellules prétraitées avec le NaBu, les niveaux d'acétylation sur les histones ont été diminués dès 30 minutes après le retrait du NaBu (Fig. 8C), tandis que les niveaux d'histone acétylée des cellules prétraitées avec le TSA ont persisté jusqu'à 2 heures après l'enlèvement de celui-ci (Fig. 8D). Ces résultats montrent donc que les niveaux globaux d'acétylation induits par le NaBu et le TSA sur les histones sont rapidement réversibles.

Figure 8. Réversibilité de l'induction de l'acétylation des histones par les inhibiteurs de désacétylases. Les cellules Caco-2/15 sous-confluentes non-traitées (contrôle) ou prétraitées pendant 1, 4 et 8 heures avec le NaBu (5 mM) (**A**) ou le TSA (1 µg/ml) (**B**) ont été lavées 3 fois avec du PBS, puis ont été remises dans du milieu de culture sans inhibiteurs de désacétylases. Les histones ont été extraites immédiatement après les lavages au PBS (-), ou 12 heures suivant les lavages (12 h), puis les niveaux d'acétylation ont été vérifiés par buvardage Western à l'aide d'un anticorps anti-lysine-acétylée. Les niveaux d'histones ont été vérifiés par coloration au Rouge de Ponceau et l'extrait d'histones des cellules non-traitées a été utilisé comme contrôle. **C, D.** Les cellules Caco-2/15 ont été traitées avec le NaBu (**C**) ou le TSA (**D**) pendant 12 heures, lavées 3 fois avec le PBS, puis remises en culture sans inhibiteurs de désacétylases. Les extraits d'histones ont été effectués immédiatement après les lavages (0), 30 minutes, 2 heures, 4 heures ou 8 heures suivant les lavages, puis les niveaux d'acétylation ont été évalués par buvardage Western avec l'anticorps anti-lysine acétylée. Les niveaux d'histones ont été vérifiés par coloration au Rouge Ponceau.

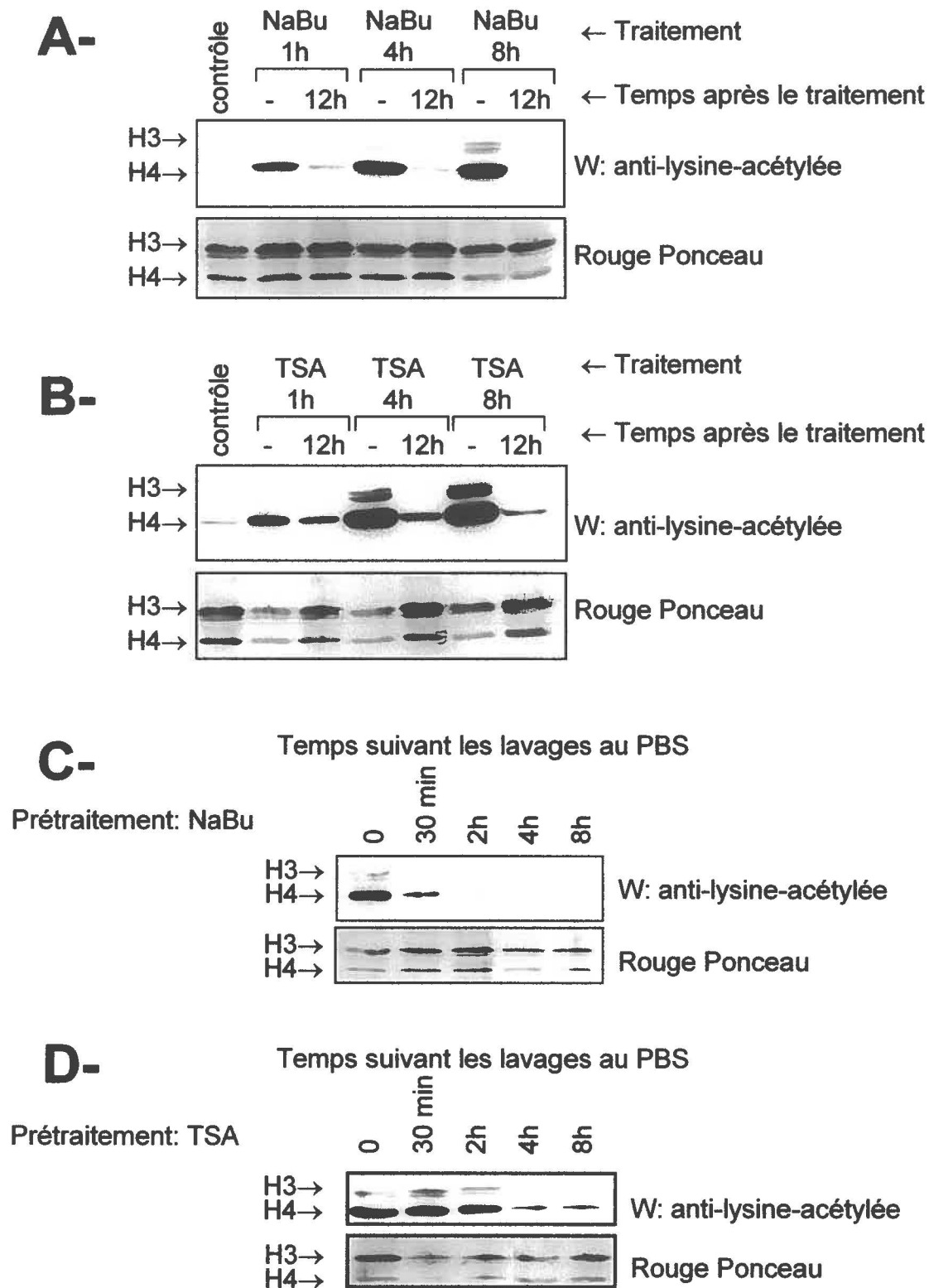


Figure 8

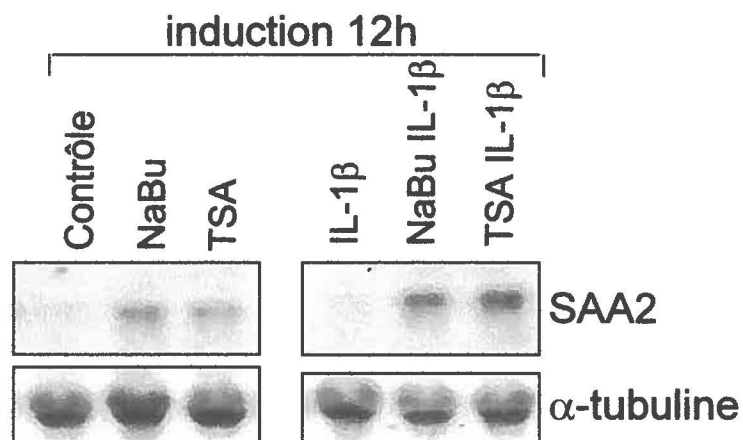
Nous avons alors voulu vérifier l'importance de l'ordre des événements entourant la régulation de l'expression de SAA2 par les inhibiteurs de désacétylases. Nous avons utilisé les cellules Caco-2/15 à sous-confluence puisque, dans ces cellules, la combinaison d'un inhibiteur de désacétylases est essentielle à l'induction spécifique de l'expression de SAA2 par l'IL-1 β . Les cellules ont d'abord été traitées avec les inhibiteurs de désacétylases ou de l'IL-1 β pendant 4 heures, suivi de plusieurs lavages avec du PBS, pour finalement incuber les cellules avec les inhibiteurs de désacétylases, seuls ou en combinaison avec l'IL-1 β , pendant 12 heures.

Le prétraitement de 4 heures avec l'IL-1 β a permis l'induction de l'ARNm de SAA2 suivant l'incubation avec le NaBu et le TSA, seuls ou en combinaison avec l'IL- β (Fig. 9A). Ceci suggère qu'un traitement transitoire avec l'IL-1 β peut préparer le promoteur SAA2 pour une induction subséquente de son expression par les inhibiteurs de désacétylases.

De la même façon, un prétraitement de 4 heures des cellules Caco-2/15 sous-confluentes avec le NaBu ou le TSA a été suffisant pour permettre l'induction de l'expression de *SAA2* après une incubation avec l'IL-1 β seul et ce, à des niveaux équivalents à ceux induits par la combinaison simultanée d'IL-1 β et d'inhibiteurs de désacétylases (Fig. 9B). Ces résultats démontrent donc que l'induction transitoire des niveaux globaux d'acétylation par les inhibiteurs de désacétylases peut prédisposer le promoteur SAA2 à une stimulation subséquente de son expression par une cytokine pro-inflammatoire, tel que l'IL-1 β .

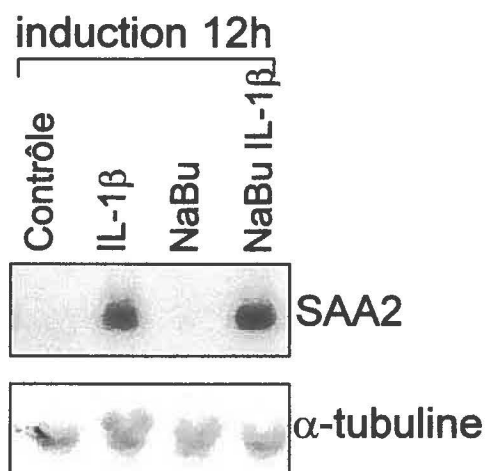
Figure 9. Établissement de l'expression synergique de SAA2 par traitements transitoires avec les inhibiteurs de désacétylases ou avec l'IL-1 β . (A) Les cellules Caco-2/15 ont été prétraitées pendant 4 heures avec l'IL-1 β (10 ng/ml), lavées 3 fois avec le PBS puis traitées pendant 12 heures sans (contrôle) ou avec l'IL-1 β , le NaBu (5 mM), et le TSA (1 μ g/ml), seuls ou en combinaison. Les extraits d'ARN total ont été analysés par buvardage Northern avec la sonde SAA2 radiomarquée au [α ³²P]dCTP. La sonde α -tubuline a été utilisée pour évaluer les quantités d'ARN. (B) Les cellules Caco-2/15 sous-confluentes prétraitées 4 heures avec le NaBu (5 mM) ou le TSA (1 μ g/ml) ont été lavées 3 fois avec le PBS, puis traitées pendant 12 heures sans (contrôle) ou avec l'IL-1 β , le NaBu et le TSA, seuls ou en combinaison. Les extraits d'ARN total ont été analysés par buvardage Northern avec la sonde SAA2 radiomarquée au [α ³²P]dCTP, puis les quantités d'ARN utilisées ont été évaluées avec la sonde α -tubuline.

A- Préincubation IL-1 β : 4 h



B-

Préincubation NaBu: 4 h



Préincubation TSA: 4 h

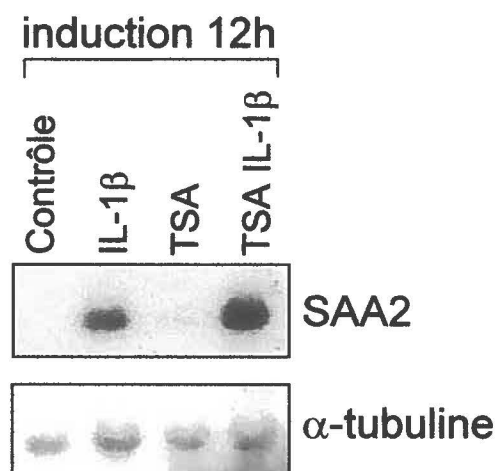


Figure 9

1.3. L'activité de liaison à l'ADN in vitro du facteur de transcription NF- κ B induite par l'IL-1 β n'est pas affectée par les inhibiteurs de désacétylases.

NF- κ B joue un rôle majeur au niveau de la régulation de l'expression des gènes de réponse inflammatoire, dont *SAA2* (voir plus loin). Plusieurs évidences ont démontré que certaines modifications post-traductionnelles de ce facteur de transcription, comme l'acétylation et la phosphorylation, pouvaient affecter sa capacité de lier l'ADN de façon générale (Zhong *et al.*, 2002; Chen et Greene, 2003; Kiernan *et al.*, 2003). Nous avons donc vérifié l'activité de liaison à l'ADN de ce facteur de transcription en présence d'inhibiteur de désacétylases.

Les cellules Caco-2/15 sous-confluentes, confluentes et 3 jours post-confluentes ont d'abord été traitées pendant 4 heures avec l'IL-1 β , le NaBu et le TSA, seuls ou en combinaison. Après quoi les extraits nucléaires ont été analysés par gels de rétention. À court terme, les niveaux de base et les niveaux induits de liaison à l'ADN de NF- κ B n'ont pas été affectés par les inhibiteurs de désacétylases, que ce soit dans les cellules sous-confluentes (-2), confluentes (0) ou 3 jours post-confluentes (3) (Fig. 10A). Plus précisément, l'IL-1 β a induit l'activité de liaison à l'ADN des sous-unités p50 et p65 du facteur de transcription NF- κ B, et les inhibiteurs de désacétylases n'ont pas affecté cette activité, tel que démontré par essais supershift (Fig. 10B).

Figure 10. Effet des inhibiteurs de désacétylases sur l'induction de l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B par l'IL-1 β . Les cellules Caco-2/15 sous-confluentes (-2), confluentes (0) et 3 jours post-confluentes (3) ont été traitées pendant 4 heures avec l'IL-1 β (10 ng/ml), le NaBu (5 mM), le TSA (1 μ g/ml) et la combinaison d'IL-1 β et de NaBu ou de TSA. Les extraits nucléaires ont été incubés avec un oligonucléotide radiomarké au [α^{32} P]dCTP et correspondant au site consensus de liaison à l'ADN de NF- κ B (**A**). Les complexes ADN-protéine ont été séparés de la sonde libre sur gel de polyacrylamide non-dénaturant. Pour les essais supershift (**B**), les extraits nucléaires ont d'abord été incubés avec ou sans (-) les anticorps contre les sous-unités p50 et p65 de NF- κ B, avant d'ajouter l'oligonucléotide NF- κ B radiomarké.

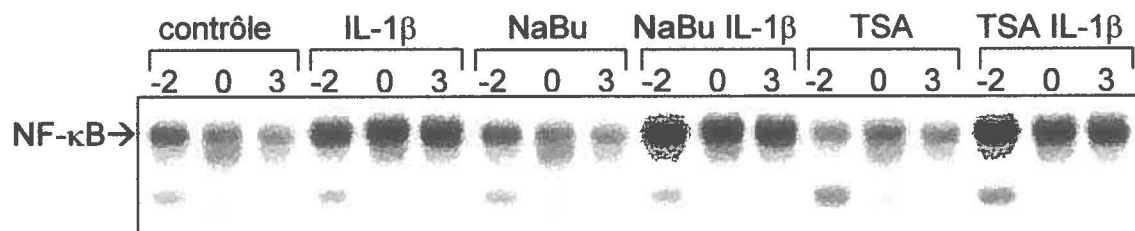
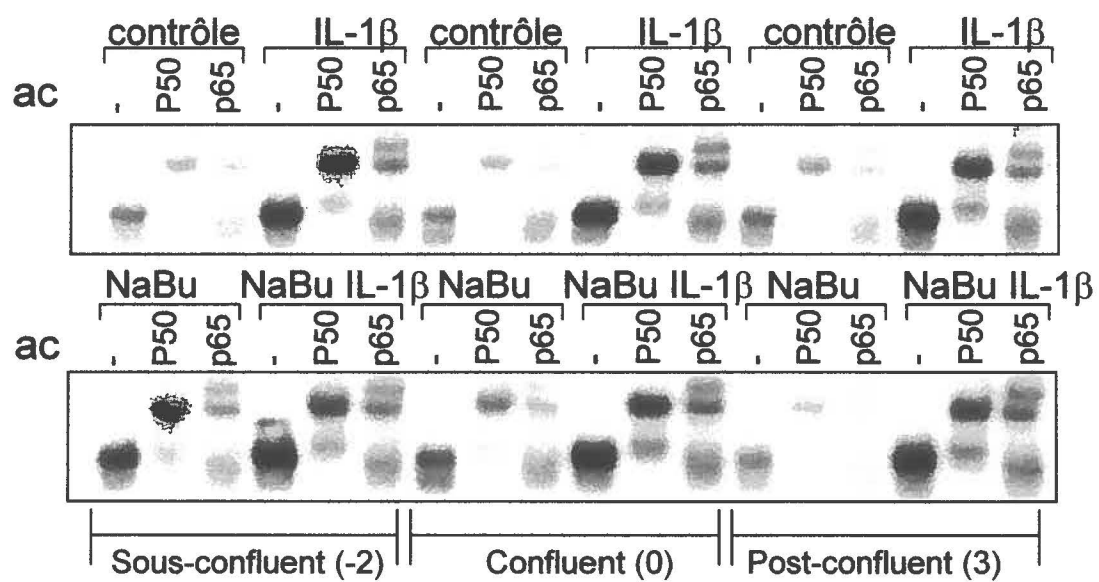
A-**B-**

Figure 10

1.4. La régulation par l'IL-1 β de l'activité de liaison à l'ADN in vitro des isoformes C/EBP α et C/EBP δ est modulée par les inhibiteurs de désacétylases.

La famille des facteurs de transcription C/EBP est aussi impliquée dans le contrôle de l'expression du gène de réponse inflammatoire *SAA2* (voir plus loin). L'effet des inhibiteurs de désacétylases sur l'activité de liaison à l'ADN des C/EBP induite par l'IL-1 β a donc été également vérifié par gel de rétention à l'aide d'un oligonucléotide double brin représentant un site de liaison à l'ADN spécifique aux C/EBPs. D'abord, les niveaux de base de liaison à l'ADN des C/EBPs étaient plus élevés dans les cellules Caco-2/15 confluentes (0), comparativement aux niveaux mesurés dans les cellules sous-confluentes (-2) et 3 jours post-confluentes (3) (Fig. 11A). Bien que l'activité globale de liaison à l'ADN des C/EBPs n'était pas induite par l'IL-1 β , l'essai supershift a démontré un changement au niveau de la composition des isoformes liés à l'ADN (Fig. 11B). En effet, un traitement de 4 heures avec l'IL-1 β a augmenté la présence de l'isoforme C/EBP δ sur l'ADN et diminué celle de l'isoforme C/EBP α , sans toutefois affecter les niveaux de liaison à l'ADN de C/EBP β . De plus, la combinaison de NaBu (Fig. 11B) ou de TSA (non-montré) avec l'IL-1 β permet de rétablir la composition basale des isoformes C/EBP au niveau de la liaison à l'ADN.

Une analyse par buvardage Northern a démontré qu'un traitement avec l'IL-1 β diminuait en fait l'expression de l'isoforme C/EBP α et augmentait celle de l'isoforme C/EBP δ , mais que la combinaison avec un inhibiteur de désacétylase abolissait ces modifications (Fig.12). Ces résultats suggèrent donc que l'induction de l'activité de liaison à l'ADN des C/EBPs par l'IL-1 β est modulée par le NaBu et le TSA au niveau transcriptionnel.

Figure 11. Effet des inhibiteurs de désacétylases sur l'induction de l'activité de liaison à l'ADN des C/EBP par l'IL-1 β . Les cellules Caco-2/15 sous-confluentes (-2), confluentes (0) et 3 jours post-confluentes (3) ont été traitées pendant 4 heures avec l'IL-1 β (10 ng/ml), le NaBu (5 mM), le TSA (1 μ g/ml) et la combinaison d'IL-1 β et de NaBu ou de TSA. Les extraits nucléaires ont été incubés avec un oligonucléotide radiomarké au [α ³²P]dCTP et correspondant au site de liaison à l'ADN spécifique à C/EBP (HaptoA) **(A)**. Les complexes ADN-protéine ont été séparés de la sonde libre sur gel de polyacrylamide non-dénaturant. Pour les essais supershift **(B)**, les extraits nucléaires ont d'abord été incubés avec ou sans (-) les anticorps contre les isoformes C/EBP α , C/EBP β et C/EBP δ , avant d'ajouter l'oligonucléotide HaptoA radiomarké.

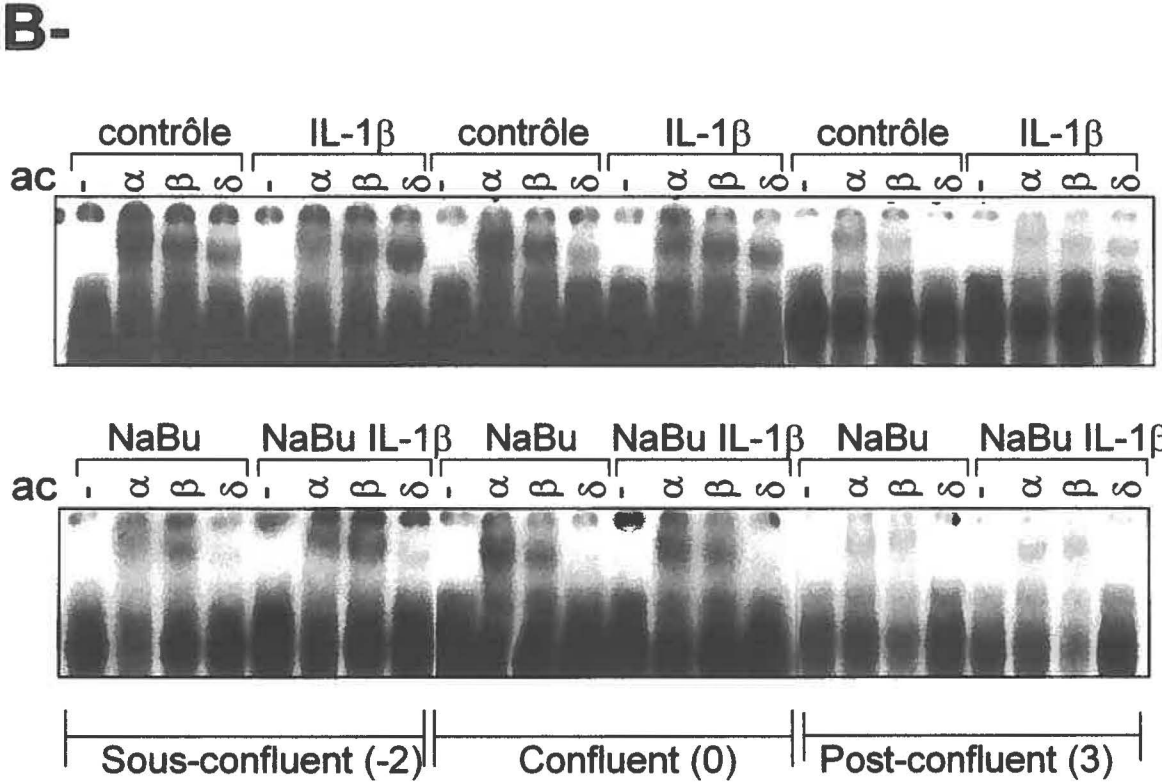
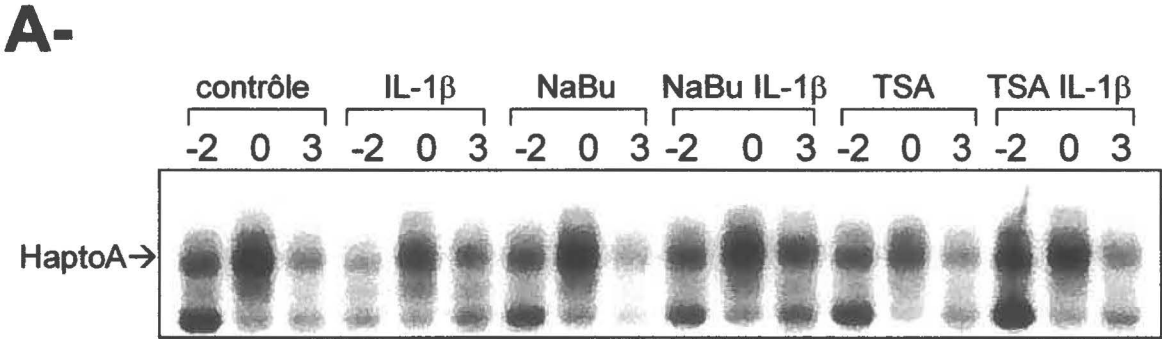


Figure 11

Figure 12. Régulation de l'expression des isoformes C/EBP α et C/EBP δ par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases. Les cellules Caco-2/15 sous-confluentes (S-C) et 3 jours post-confluentes (P-C) ont été traitées pendant 4 heures avec l'IL-1 β (10 ng/ml), le NaBu (5 mM) et le TSA (1 μ g/ml), seuls ou en combinaison. Les extraits d'ARN total ont été analysés par buvardage Northern avec les sondes C/EBP α et C/EBP δ radiomarquées au [α^{32} P]dCTP, puis la quantité d'ARN a été évaluée par hybridation avec la sonde α -tubuline.

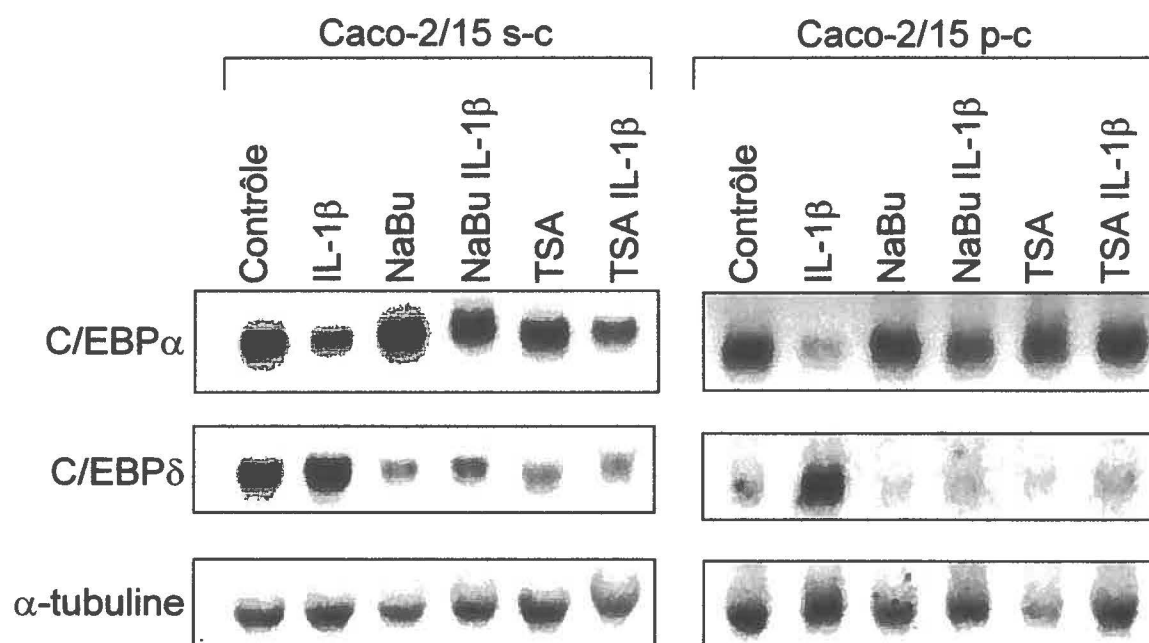


Figure 12

1.5. Les sites de liaisons à l'ADN de C/EBP et de NF- κ B sur le promoteur SAA2 jouent un rôle différent au niveau de la synergie entre les inhibiteurs de désacétylases et l'IL-1 β .

Nous avons d'abord introduit des mutations site-spécifiques des sites de liaison à l'ADN de C/EBP et de NF- κ B dans le promoteur du gène rapporteur SAA2luc dans le but de déterminer le rôle de chacun de ces sites au niveau de la régulation de l'expression du gène *SAA2*. Par gel de rétention, nous avons d'abord démontré que l'activité de liaison à l'ADN de C/EBP et de NF- κ B était diminuée par ces mutations (non-montré). Par la suite, les cellules Caco-2/15 sous-confluentes et 3 jours post-confluentes ont été transfectées avec les constructions de type sauvage (SAA2wt), C/EBP mutante (SAA2 C/EBPmut.) ou NF- κ B mutante (SAA2 NF- κ Bmut.), puis traitées avec l'IL-1 β , le NaBu et le TSA, seuls ou en combinaison. Les essais luciférase dans les cellules Caco-2/15 sous-confluentes (Fig. 13A) et 3 jours post-confluentes (Fig. 13B) ont démontré que la mutation du site de liaison à l'ADN de C/EBP diminuait significativement l'induction par l'IL-1 β ainsi que la synergie entre l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases, tandis que la mutation du site NF- κ B supprimait complètement l'expression de SAA2luc. Ces résultats nous permettent donc d'établir que la liaison de NF- κ B sur le promoteur est d'une importance capitale pour l'expression de *SAA2*, tandis que le site de liaison à l'ADN de C/EBP joue plutôt un rôle sur les niveaux d'expression de *SAA2* en réponse à l'IL-1 β et aux inhibiteurs de désacétylases.

Figure 13. Rôle des sites de liaison à l'ADN de C/EBP et NF- κ B sur le promoteur SAA2 au niveau de la synergie réalisée par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases. Les cellules Caco-2/15 sous-confluentes (S-C) **(A)** et 3 jours post-confluentes (P-C) **(B)** ont été transfectées de façon transitoire avec les constructions SAA2 normal (SAA2wt), SAA2 muté sur le site de liaison des C/EBPs (SAA2 C/EBPmut) et SAA2 muté sur le site de liaison de NF- κ B (SAA2 NF- κ Bmut). Par la suite, les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec l'IL-1 β (10 ng/ml), le NaBu (5 mM) et le TSA (1 μ g/ml), seuls ou en combinaison. L'induction de l'activité luciférase a été évaluée par comparaison avec celle des cellules non-traitées (contrôle). Les barres d'erreur ont été évaluées en fonction de la déviation standard de quatre expériences indépendantes représentatives effectuées en triplicata.

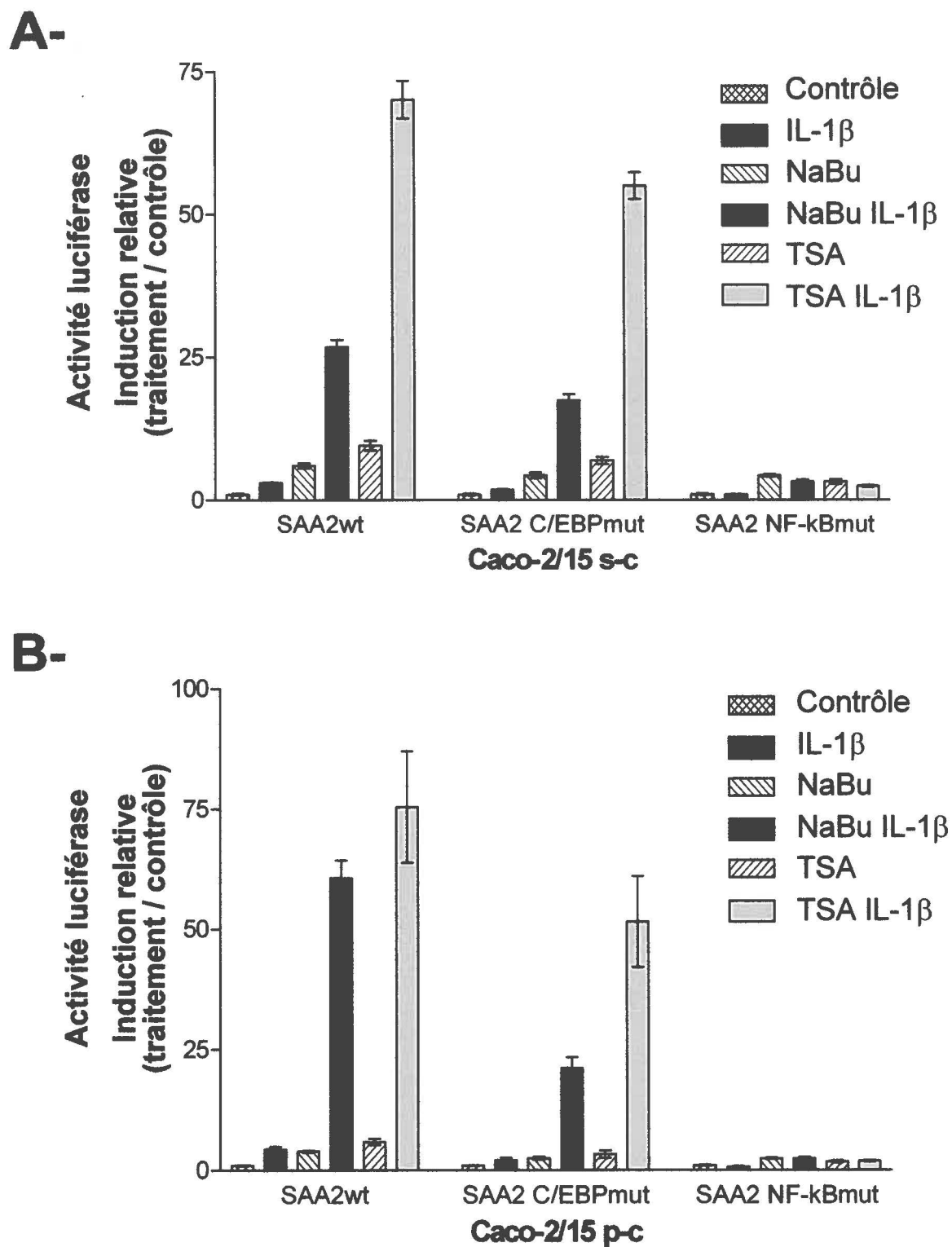


Figure 13

1.6. L'induction de l'expression de SAA2 requiert à la fois les changements au promoteur apportés par le butyrate et ceux apportés par l'IL-1 β dans les cellules Caco-2/15 sous-confluentes.

Afin de déterminer les changements apportés *in vivo* aux promoteurs SAA2 et IL-8 par l'IL-1 β et du NaBu, nous avons procédé à l'immunoprécipitation de la chromatine des cellules Caco-2/15 sous-confluentes traitées pendant 4 heures avec l'IL-1 β , le NaBu ou leur combinaison. L'amplification des fragments correspondant à la région proximale des promoteurs SAA2 (-215 à -33) et IL-8 (-121 à +61) (Fig. 14A), contenant les sites d'intérêt de liaison à l'ADN de C/EBP et de NF- κ B, a été effectuée de façon semi-quantitative en sélectionnant le nombre de cycles d'amplification en fonction de la phase linéaire. Nous avons d'abord vérifié les niveaux d'acétylation sur les histones H3 et H4 sur ces promoteurs. Aucune hyperacétylation de l'histone H3 n'a été détectée au niveau du promoteur SAA, alors que des niveaux d'acétylation de base sur l'histone H3 ont été détectés sur le promoteur IL-8 (Fig. 14B). Ces niveaux semblent avoir été légèrement augmentés par l'IL-1 β et le NaBu. Le traitement avec l'IL-1 β a également induit les niveaux d'acétylation de l'histone H4 sur les deux promoteurs, mais la combinaison de l'IL-1 β et du NaBu a permis l'augmentation des niveaux d'acétylation de l'histone H4 induits sur le promoteur SAA2 uniquement, comparativement aux niveaux induits par l'IL-1 β . Nous avons par la suite vérifié l'effet du NaBu et de l'IL-1 β au niveau du recrutement sur les promoteurs des sous-unités p50 et p65 de NF- κ B, ainsi que des isoformes C/EBP α , C/EBP β et C/EBP δ . Dans les cellules non-traitées, la sous-unité p50 de NF- κ B était liée au promoteur SAA2, contrairement à la sous-unité p65. Un traitement avec l'IL-1 β ou le NaBu a augmenté la liaison au promoteur de la sous-unité p65, mais a

Figure 14. Induction de modifications sur le promoteur proximal SAA2 et IL-8 par l'IL-1 β et le butyrate. Les cellules Caco-2/15 sous-confluentes ont été traitées pendant 4 heures avec l'IL-1 β (10 ng/ml), le NaBu (5 mM) et la combinaison d'IL-1 β et de NaBu pour effectuer les essais d'immunoprécipitation de la chromatine. D'abord, les interactions ADN-protéines ont été fixées à l'aide de formaldéhyde, suivie de la fragmentation de la chromatine et de son immunoprécipitation avec les anticorps anti-H3-acétylée, anti-H4-acétylée, anti-NF- κ B p50, anti-NF- κ B p65, anti-C/EBP α , anti-C/EBP β et anti-C/EBP δ . Aucun anticorps n'a été utilisé pour le contrôle (sans ac). La chromatine recueillie a été analysée par PCR avec les oligonucléotides amplifiant la région -215 à -33 du promoteur SAA2, ainsi qu'avec les oligonucléotides amplifiant la région -121 à +61 du promoteur IL-8. 10% de l'ADN de départ a été conservé afin d'évaluer les niveaux d'ADN dans chaque condition (ADN initial). Les produits amplifiés ont été séparés sur gel d'agarose 1.5%, puis visualisés par coloration au bromure d'éthidium.

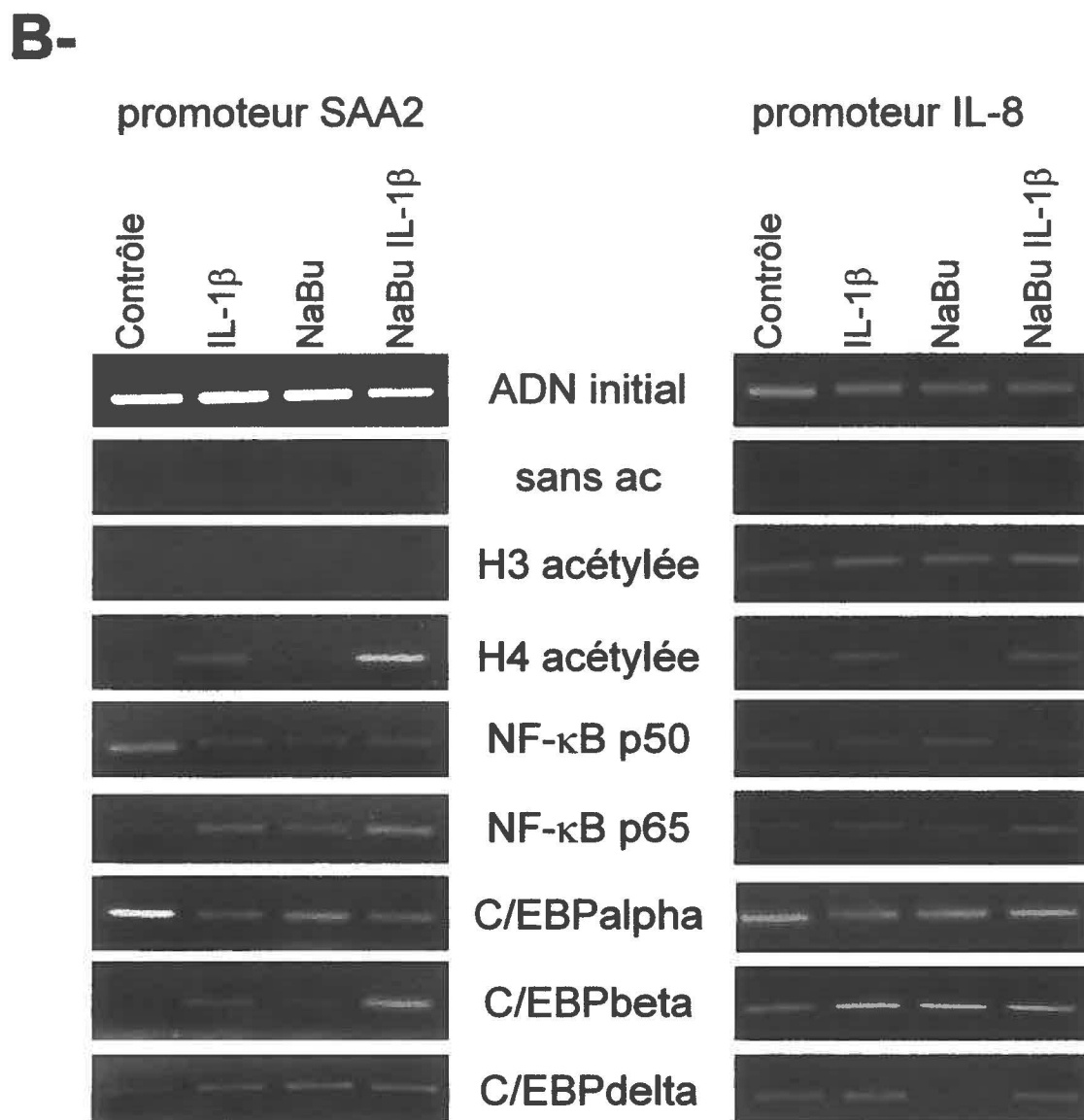
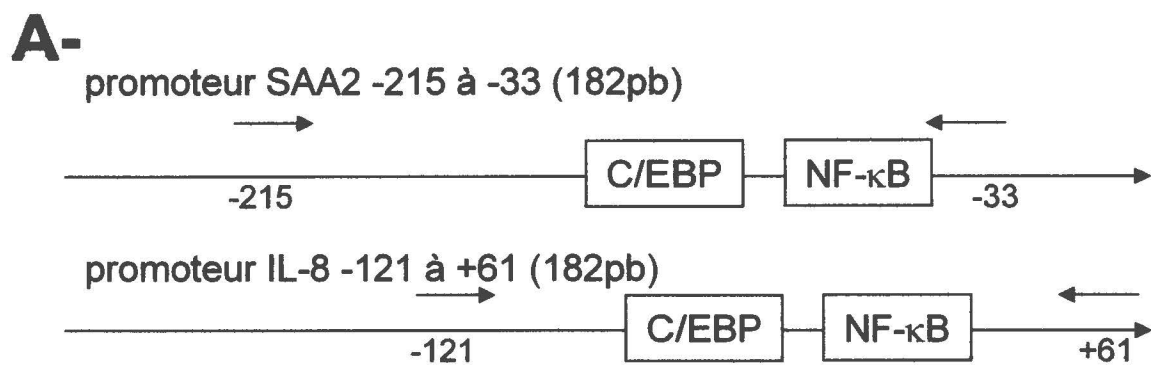


Figure 14

diminué celle de p50 (Fig. 14B). Les isoformes C/EBP α et C/EBP δ liaient la région proximale du promoteur SAA2 dans les cellules non-traitées. Un traitement avec l'IL-1 β ou le NaBu a diminué la liaison de l'isoforme C/EBP α , tandis que celle de C/EBP δ a été augmentée. La présence de l'isoforme C/EBP β au promoteur SAA2 a été également induite par l'IL-1 β et le NaBu, et ces niveaux ont été augmentés par la combinaison de l'IL-1 β et du NaBu. Ces résultats suggèrent donc que le NaBu et l'IL-1 β stimulent l'expression du gène *SAA2* en induisant de façon indépendante le recrutement au promoteur de NF- κ B p65, C/EBP β et C/EBP δ , tout en diminuant la présence de NF- κ B p50 et C/EBP α . La présence d'IL-1 β et de NaBu augmente l'occupation du promoteur par NF- κ B p65 et C/EBP β , de même que l'acétylation de l'histone H4.

Tous les facteurs de transcription étaient présents sur le promoteur de l'IL-8 dans les cellules non-traitées. La présence de la sous-unité p50 de NF- κ B était relativement stable sur le promoteur, indépendamment des traitements, mais la présence de la sous-unité p65 a été légèrement augmentée dans les cellules traitées avec l'IL-1 β , seul ou en combinaison avec le NaBu. La liaison de l'isoforme C/EBP α semble avoir été faiblement diminuée par l'IL-1 β et le NaBu, tandis que celle de l'isoforme C/EBP β a plutôt été augmentée. Finalement, l'IL-1 β , seul ou en combinaison avec le NaBu, a peu affecté la présence de l'isoforme C/EBP δ sur le promoteur de l'IL-8. Cependant, la liaison de C/EBP δ au promoteur IL-8 a été réprimée dans les cellules traitées avec le NaBu uniquement. Ces données démontrent donc que l'induction de l'expression de l'IL-8 par l'IL-1 β implique l'augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4, la diminution de

liaison au promoteur de l'isoforme C/EBP α , puis l'augmentation de la présence de la sous-unité p65 de NF- κ B et de l'isoforme C/EBP β . De plus, la présence de l'isoforme C/EBP δ est diminuée dans les cellules traitées avec le NaBu, alors que la présence de l'isoforme C/EBP β semble plutôt être augmentée. Finalement, le NaBu ne semble pas induire de changements notables sur les modifications apportées par l'IL-1 β après 4 heures sur le promoteur IL-8.

2- Effets du butyrate sur l'expression des gènes de réponse inflammatoire dans les cellules intestinales épithéliales humaines.

2.1. Induction rapide des niveaux globaux d'acétylation sur les histones à la suite de l'inhibition des désacétylases par le butyrate.

Afin de vérifier si le NaBu pouvait augmenter les niveaux d'acétylation dans les cellules intestinales épithéliales humaines HIEC-6 non-transformées, nous avons vérifié l'état global de l'acétylation sur les histones dans les cellules traitées pendant différents temps avec le NaBu ou le TSA. L'induction de l'acétylation des histones H3 et H4 a été détectée après 2 heures d'incubation avec le TSA ou 4 heures d'incubation avec le NaBu, tel que démontré par buvardage Western à l'aide d'un anticorps anti-lysine-acétylée (Fig. 15). L'augmentation graduelle des niveaux d'acétylation a été observée jusqu'à 24 heures de traitement. Ainsi, ce résultat confirme que le NaBu peut rapidement induire les niveaux globaux d'acétylation dans les cellules HIEC-6.

2.2. Le butyrate augmente l'activité de liaison à l'ADN in vitro de NF- κ B dans les cellules non-induites et diminue les niveaux de liaison à l'ADN de C/EBP induits par l'IL-1 β .

Nous avons précédemment démontré que, dans les cellules Caco-2/15, les inhibiteurs de désacétylases pouvaient affecter spécifiquement l'activité de liaison à l'ADN *in vitro* des facteurs de transcription C/EBPs, contrairement à NF- κ B (Fig. 10 et Fig. 11). Nous avons donc voulu vérifier si le NaBu pouvait moduler les niveaux de liaison à l'ADN des facteurs de transcription NF- κ B et C/EBP dans les cellules HIEC-6. Les extraits de

Figure 15. Effet des inhibiteurs de désacétylases sur les niveaux d'acétylation des histones dans les cellules intestinales épithéliales HIEC-6. Les histones ont été isolées de cellules HIEC-6 non-traitées (contrôle) ou traitées pendant 1, 2, 4, 8, 12 et 24 heures avec le NaBu (5 mM) ou le TSA (1 µg/ml), séparées sur gel d'acrylamide SDS-PAGE 15%, transférées sur membrane PVDF puis analysées par buvardage Western à l'aide d'un anticorps anti-lysine-acétylée. La quantité de protéine a été vérifiée par coloration au Rouge Ponceau.

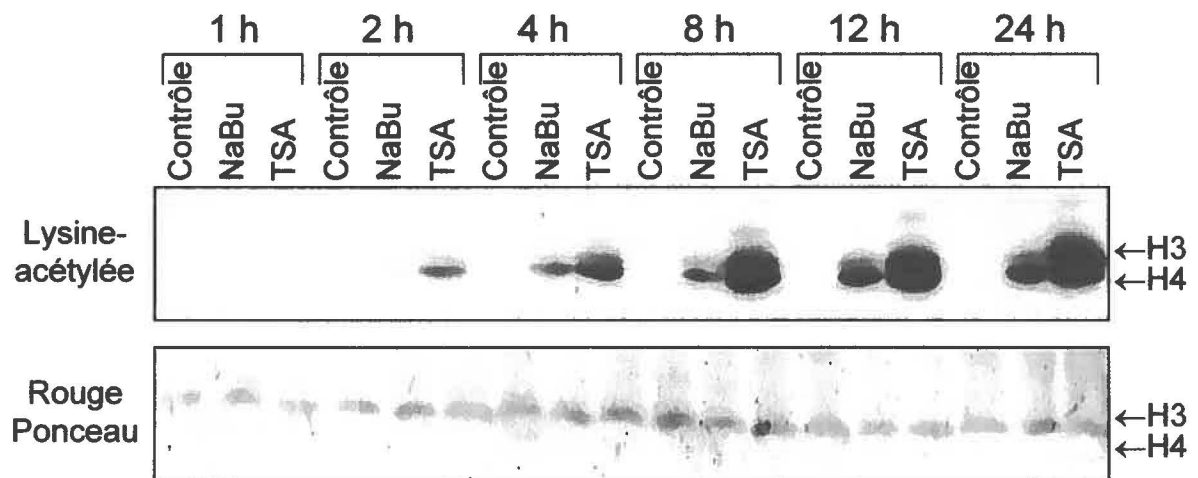


Figure 15

protéines nucléaires ont été faits à partir de cellules traitées pendant 4 heures avec l'IL-1 β , le NaBu et le TSA, seuls ou en combinaison, puis les niveaux de liaison à l'ADN ont été mesurés par gels de rétention avec les oligonucléotides correspondant au site consensus de liaison à l'ADN de NF- κ B et à un site de liaison à l'ADN spécifique aux C/EBPs (HaptoA).

Dans les HIEC-6, l'activité de liaison à l'ADN *in vitro* de NF- κ B est augmentée par le NaBu et le TSA (Fig. 16A) avec une induction de la liaison à l'ADN des sous-unités p50 et p65 de NF- κ B, tel que démontré par supershift (Fig. 16B). L'IL-1 β a permis d'induire de façon plus importante les niveaux de liaison à l'ADN des sous-unités p50 et p65 de NF- κ B, et ces niveaux n'ont pas été modifiés en présence de NaBu ou de TSA. L'ajout de NaBu et de TSA a peu affecté l'activité de liaison à l'ADN *in vitro* du facteur de transcription C/EBP (Fig. 16C). Un traitement à l'IL-1 β a augmenté la liaison à l'ADN des isoformes C/EBP β et C/EBP δ (Fig. 16D). Ces niveaux de liaison ont été réprimés par l'ajout de NaBu ou de TSA. Ainsi, l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B est affectée positivement par l'inhibition des désacétylases dans les cellules non-stimulées, alors que l'induction par l'IL-1 β de l'activité de liaison à l'ADN des C/EBPs est affectée négativement par l'ajout de NaBu ou de TSA. Ceci suggère que le NaBu pourrait moduler la régulation de l'expression des gènes cibles de NF- κ B et de C/EBP dans les cellules HIEC-6 en affectant spécifiquement l'activité de liaison à l'ADN de ces facteurs de transcription en fonction du contexte inflammatoire.

Figure 16. Régulation de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription NF- κ B et C/EBP par les inhibiteurs de désacétylases. Les extraits nucléaires de cellules HIEC-6 traitées pendant 4 heures avec l'IL-1 β (10 ng/ml), le NaBu (5 mM) et le TSA (1 μ g/ml), seuls ou en combinaison, ont été incubés avec un oligonucléotide radiomarké au [α^{32} P]dCTP correspondant au site consensus de liaison à l'ADN de NF- κ B (**A, B**) ou correspondant à un site de liaison à l'ADN spécifique aux C/EBPs (HaptoA) (**C, D**). Les complexes ADN-protéine ont été séparés de la sonde libre sur gel de polyacrylamide non-dénaturant. Les essais supershift ont été effectués en incubant d'abord les extraits nucléaires sans (-) ou avec les anticorps contre les sous-unités p50 et p65 de NF- κ B suivie de l'addition de la sonde NF- κ B radiomarkée (**B**) ou avec les anticorps contre les isoformes C/EBP α , C/EBP β et C/EBP δ avant d'ajouter la sonde HaptoA radiomarkée (**D**).

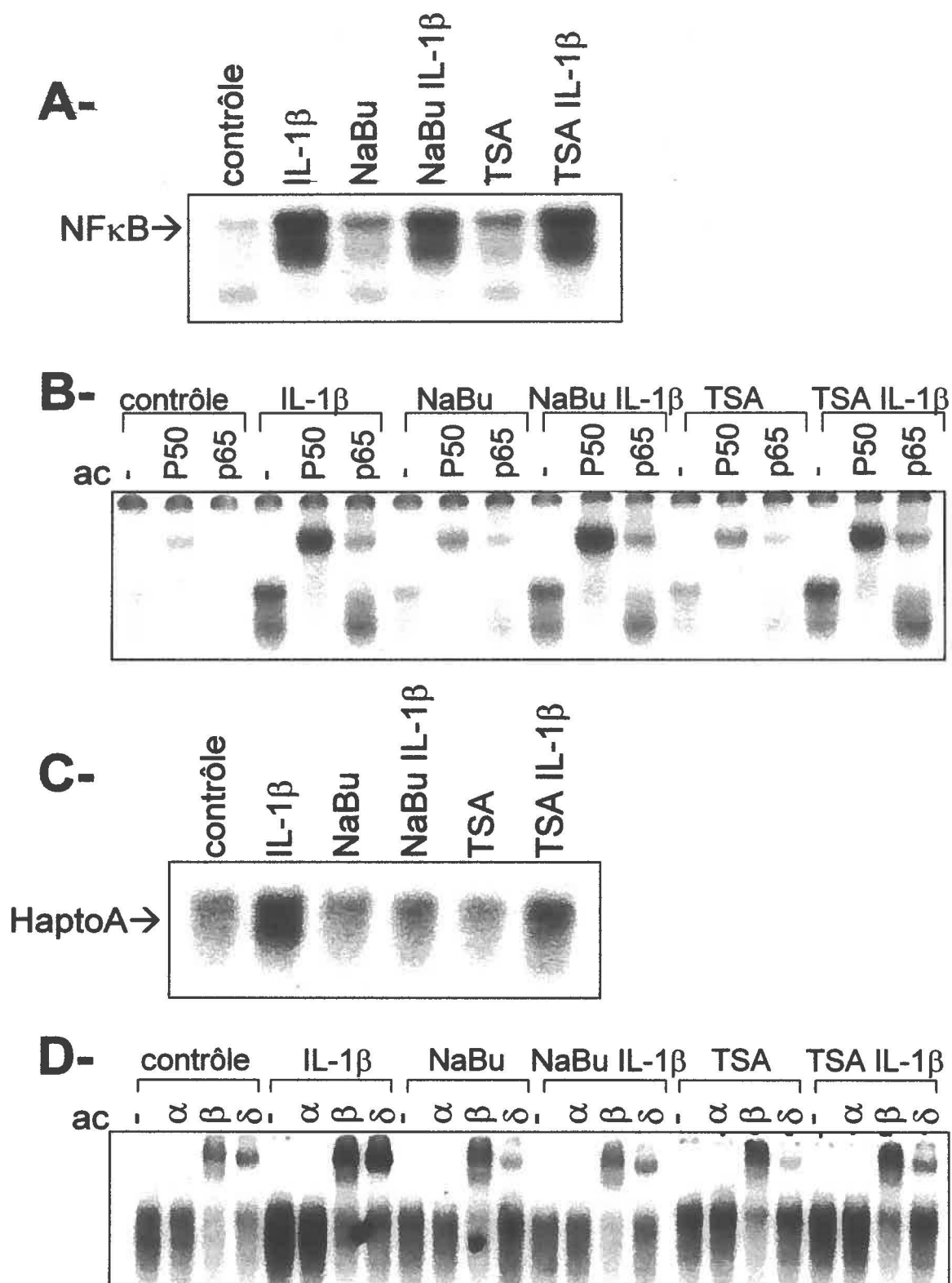


Figure 16

2.3. L'IL-1 β et le butyrate contrôlent de façon spécifique l'expression des gènes de réponse inflammatoires *SAA2* et *IL-8* dans les cellules HIEC-6.

Dans les cellules HIEC-6, le butyrate induit rapidement les niveaux globaux d'acétylation sur les histones, apportant ainsi des modifications au niveau de la structure de la chromatine. De plus, le NaBu diminue de façon importante l'induction par l'IL-1 β de la liaison à l'ADN des C/EBPs. Ceci suggère donc la modulation possible de l'expression de divers gènes, dont ceux impliqués lors de la réponse inflammatoire intestinale. Nous avons donc vérifié les niveaux d'ARNm de deux gènes de réponse inflammatoire, soient *SAA2* et *IL-8*, dans les HIEC-6 à la suite d'un traitement avec l'IL-1 β , le NaBu et le TSA, seuls ou en combinaison. D'abord, l'expression des gènes *SAA2* et *IL-8* n'a pas été induite dans les cellules non-traitées ou traitées avec le NaBu ou le TSA seuls (non-montré). Bien que l'expression du gène *SAA2* n'ait pas été induite par l'IL-1 β seul, une induction synergique a été détectée dès 8 heures suivant le traitement des cellules avec une combinaison d'IL-1 β et de NaBu ou de TSA, tel que démontré par buvardage Northern (Fig. 17A). Les niveaux d'ARNm de l'IL-8 ont pour leur part été induits après 2 heures de traitement avec l'IL-1 β seul, et les niveaux induits ont été maintenus jusqu'à 24 heures. Les niveaux induits d'IL-8 sont demeurés insensibles à l'ajout de NaBu ou de TSA. De plus, l'activité transcriptionnelle du promoteur *SAA2* a été induite de façon synergique par la combinaison d'IL-1 β et de NaBu ou de TSA, alors que celle du promoteur *IL-8* n'a pas été modulée par l'ajout de NaBu ou de TSA, tel qu'observé par transfections transitoires et essais luciférase (Fig. 17B). Ceci démontre donc que le NaBu régule spécifiquement, et non globalement, l'induction de l'expression de gènes de réponse inflammatoire au niveau transcriptionnel.

Figure 17. Régulation de l'expression des gènes SAA2 et IL-8 par les inhibiteurs de désacétylases dans les cellules intestinales épithéliales. (A) Les cellules HIEC-6 ont été traitées pendant 2, 4, 8 et 24 heures avec l'IL-1 β (10 ng/ml), le NaBu (5 mM), et le TSA (1 μ g/ml), seuls ou en combinaison. Les extraits d'ARN total ont été analysés par buvardage Northern à l'aide des sondes SAA2 et IL-8 radiomarquées au [α^{32} P]dCTP, et la quantité d'ARN a été vérifiée par hybridation de la sonde α -tubuline. (B) Les cellules HIEC-6 ont été transfectées de façon transitoire avec les gènes rapporteurs SAA2luc et IL-8luc, puis traitées pendant 8 ou 24 heures avec l'IL-1 β , le NaBu, le TSA ou la combinaison d'IL-1 β et d'un ou l'autre des inhibiteurs de désacétylases. Les niveaux d'induction de l'activité luciférase ont été évalués par comparaison avec ceux des cellules non-traitées (contrôle). Les barres d'erreur ont été évaluées en fonction de la déviation standard de quatre expériences indépendantes représentatives effectuées en triplicata.

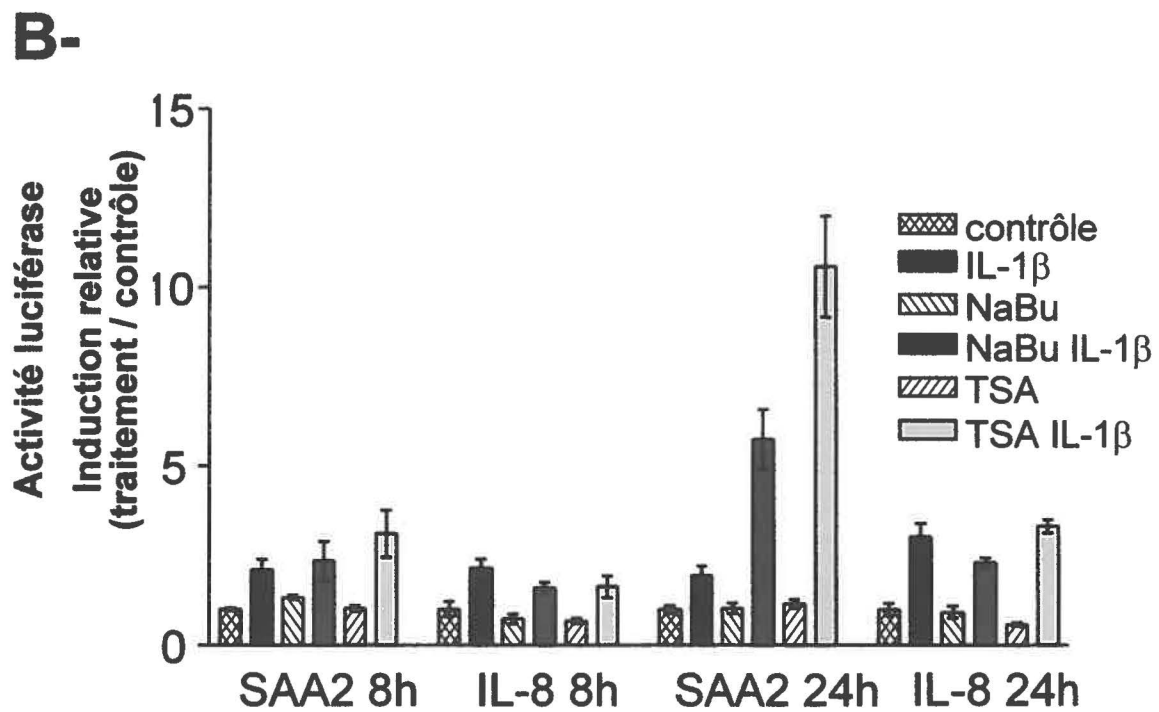
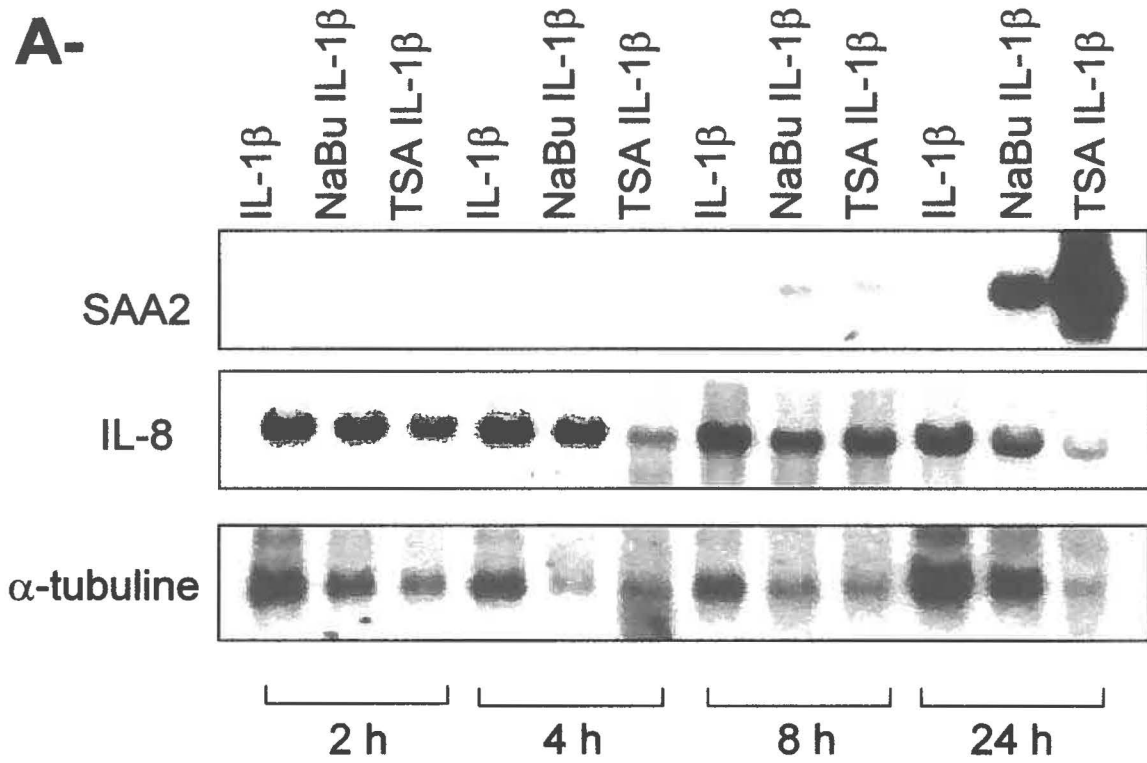


Figure 17

2.4. Le butyrate joue un double rôle au niveau de la régulation des gènes de réponse inflammatoire dans les cellules HIEC-6.

Nous avons voulu vérifier plus précisément l'impact global du NaBu sur l'expression génique dans les cellules intestinales épithéliales. Pour ce faire, nous avons effectué l'analyse par micropuces d'ADN de l'expression des gènes dans les cellules HIEC-6 traitées pendant 8 heures avec l'IL-1 β et le NaBu, seuls ou en combinaison. Au total, plus de 47 000 transcrits présents sur les micropuces ont été hybridés avec l'ADNc obtenu à partir de l'ARNm recueilli des cellules. Le profil de l'expression génique des cellules traitées a été comparé à celui des cellules non-traitées (contrôle). Nous avons pu identifier plus de 1464 gènes dont l'expression était significativement augmentée dans les cellules traitées avec le NaBu (NaBu/contrôle > 2), alors que l'expression de 872 gènes a été diminuée par le NaBu (NaBu/contrôle < 0.5) ($p < 0.05$).

Nous avons alors procédé à la classification des gènes induits et réprimés par le NaBu en fonction de leur implications dans divers processus biologiques à l'aide du programme d'analyse GOCharts faisant partie de la banque de données DAVID (<http://apps1.niaid.nih.gov/david/>). Les processus biologiques affectés de façon importante par le NaBu, que ce soit positivement ou négativement, ont été identifiés et sont montrés dans le Tableau 1. L'analyse a démontré que, pour la plupart des processus biologiques, un plus grand nombre de gènes étaient induits par le NaBu, à l'exception des processus de cytokinèse, de déphosphorylation, de traitement de l'ARN et de cycle de l'ubiquitination, où un plus grand nombre de gènes était réprimé. Parmi ces gènes réprimés, on retrouve la kinase cycline-dépendante 3 (CDK3), la cycline B1 (CCNB1), la

Tableau 1. Classification des gènes contrôlés par le NaBu. L'analyse par micropuces d'ADN a été effectuée avec l'ARN total isolé de cellules HIEC-6, non-traitées (contrôle) ou traitées pendant 8 heures avec le butyrate (NaBu). Les signaux émis dans trois différentes expériences ont été analysés avec le programme Affymetrix Microarray Suite 5.0 (MAS5) et exprimés sous forme de niveau d'induction par comparaison aux cellules non-traitées. Les processus biologiques associés aux gènes réprimés ou induits au moins 2 fois en présence de NaBu ont été identifiés avec la banque de données "Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery" (DAVID).

Tableau 1**Classification des gènes contrôlés par le NaBu**

PROCESSUS BIOLOGIQUE	NOMBRE DE GÈNES	
	Répression	Induction
	NaBu/contrôle < 0.5	NaBu/contrôle > 2
apoptose	11	26
biosynthèse des protéines	10	11
cascade de protéines kinase	4	11
catabolisme des protéines	15	23
chemotaxie	1	8
cycle cellulaire	18	28
cycle de l'ubiquitine	5	3
cytokinèse	6	4
déphosphorylation	7	4
organisation cytoplasmique et biogénèse	11	21
organisation de l'ADN	4	16
organisation nucléaire et biogénèse	6	16
phosphorylation	12	26
régulation de la prolifération cellulaire	4	18
régulation de la transcription	55	84
réponse aux insectes/pathogènes/parasites	9	32
réponse de défense	13	61
réponse inflammatoire	4	17
traitement de l'ARN	8	5
transduction de signal médié par les petites GTPase	4	16
transport des ions	11	32
transport des protéines	5	12
transport intracellulaire	8	19
voie de signalisation couplée à la protéine-G	9	48
voie de signalisation des récepteurs Wnt	4	8

cycline B2 (*CCNB2*), les protéines tyrosine phosphatase (non-récepteur) de type 2, 7 et 23 (*PTPN2/7/23*), la protéine phosphatase 2A (*PPP2CA*), le facteur d'épissage 1 (*SFI*) et la protéine ubiquitine ligase E3A (*UBE3A*).

Les Tableaux 2 et 3 montrent une sélection des gènes les plus grandement affectés par le NaBu (induits ou réprimés plus de 5 fois) ainsi que le ou les principaux processus biologiques auxquels ils sont rattachés. Remarquablement, nous avons noté que les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la réponse de défense et la réponse inflammatoire étaient plutôt induits par le NaBu dans les HIEC-6. Les listes complètes des gènes de réponse de défense et de réponse inflammatoire, réprimés ou induits plus de 2 fois par le NaBu, sont montrées aux Tableaux 4 et 5 respectivement. Ainsi, selon nos résultats, le NaBu aurait plutôt un effet positif sur les niveaux d'expression des gènes de réponse inflammatoire dans les cellules épithéliales intestinales normales.

Par la suite, nous avons vérifié l'effet du butyrate sur l'expression des gènes induits par l'IL-1 β à l'aide des micropuces à ADN. L'expression d'environ 1365 gènes a été augmentée plus de 2 fois après un traitement de 8 heures avec l'IL-1 β (IL-1 β /contrôle > 2, $p < 0.05$), alors que les niveaux d'ARNm de 1758 gènes ont été augmentés dans les cellules HIEC-6 traitées 8 heures avec la combinaison d'IL-1 β et de NaBu (NaBu+IL-1 β /contrôle > 2, $p < 0.05$). Nous avons alors déterminé l'effet du NaBu sur l'induction de l'expression des gènes par l'IL-1 en comparant les niveaux d'ARNm induits par la combinaison de NaBu et d'IL-1 β à ceux induits par l'IL-1 β seul (NaBu+IL-1 β / IL-1 β). En se basant sur les résultats obtenus antérieurement par buvardage Northern ainsi que

Tableau 2. Liste d'une sélection de gènes réprimés par le NaBu. Analyse par micropuces d'ADN des gènes réprimés plus de 5 fois dans les cellules HIEC-6 après 8 heures de traitement avec le NaBu (NaBu/contrôle < 0.2). Les processus biologiques associés aux gènes réprimés en présence de NaBu ont été identifiés avec la banque de données "Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery" (DAVID).

Tableau 2
Liste d'une sélection de gènes réprimés par le NaBu

DIMINUTION*	UNIQID	SYMBOLE	GÈNE	PROCESSUS BIOLOGIQUES									
				apoptose	réponse de défense	voie de signalisation couplée à la protéine G	réponse inflammatoire	transport intracellulaire	transport des ions	phosphorylation	biosynthèse des protéines	catabolisme des protéines	cascade de protéines kinase
0,08	Hs.506152	FRS2	fibroblast growth factor receptor substrate 2	---	---	x	---	---	---	---	---	---	---
0,09	Hs.192190	CENTD2	centaurin, delta 2	---	---	x	---	---	---	---	---	---	---
0,10	Hs.131846	TAF6L	TAF6-like RNA polymerase II, p300/CBP (PCAF)-associated factor, 65kDa	---	---	---	---	---	---	---	---	---	x
0,11	Hs.440835	SF1	splicing factor 1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	x
0,12	Hs.390428	MAP3K4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	---	---	---	---	---	x	---	---	x	---
0,13	Hs.256587	PYGO1	pygopus 1	---	---	---	---	---	---	---	---	x	---
0,14	Hs.158969	C2orf3	chromosome 2 open reading frame 3	---	---	---	---	---	---	---	---	x	---
0,15	Hs.279901	TRAPPC4	trafficking protein particle complex 4	---	---	---	---	---	---	x	---	---	---
0,15	Hs.18858	PLA2G4C	phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent)	---	x	---	x	---	---	---	---	---	---
0,15	Hs.17681	TIRAP	toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein	---	x	---	x	---	---	---	---	---	---
0,16	Hs.367965	NALP12	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 12	x	x	---	x	---	x	---	x	---	---
0,17	Hs.246795	BRPF3	bromodomain and PHD finger containing, 3	---	---	---	---	---	---	---	---	x	---
0,17	Hs.89399	ATP5G2	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c, isoform 2	---	---	---	---	x	---	---	---	---	---
0,17	Hs.4099	NRD1	narditysin (N-arginine dibasic convertase)	---	---	---	---	---	---	x	---	---	---
0,17	Hs.440456	ATP5S	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit s (factor B)	---	---	---	---	x	---	---	---	---	---
0,18	Hs.454480	TBX10	T-box 10	---	---	---	---	---	---	---	---	x	---
0,18	Hs.356321	NFATC2	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2	---	---	---	---	---	---	---	---	x	---
0,18	Hs.218366	KLK4	kallikrein 4 (protease, enamel matrix, prostate)	---	---	---	---	---	---	---	x	---	---
0,18	Hs.170222	SLC9A1	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 1	---	---	---	---	x	---	---	---	---	---
0,18	Hs.159360	PTGER1	prostaglandin E receptor 1 (subtype EP1), 42kDa	---	x	---	---	---	---	---	---	---	---
0,19	Hs.354740	KCNMA1	potassium large conductance calcium-activated channel, M, alpha 1	---	---	---	---	x	---	---	---	---	---
0,19	Hs.11962	BCLG	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator)	x	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0,19	Hs.515381	TCEB3L2	transcription elongation factor B polypeptide 3C (elongin A3)	---	---	---	---	---	---	---	---	x	---
0,19	Hs.168859	ZFY	zinc finger protein, Y-linked	---	---	---	---	---	---	---	---	x	---
0,20	Hs.23248	CARD12	caspase recruitment domain family, member 12	x	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0,20	Hs.512682	CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)	---	x	---	---	---	---	---	---	---	---
0,20	Hs.282331	SIRT5	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 5 (S. cerevisiae)	---	---	---	---	---	---	---	---	x	---

DIMINUTION*: NaBu / contrôle, p < 0.05

Tableau 3. Liste d'une sélection de gènes induits par le NaBu. Analyse par micropuces d'ADN des gènes induits plus de 5 fois dans les cellules HIEC-6 après 8 heures de traitement avec le NaBu (NaBu/contrôle > 5). Les processus biologiques associés aux gènes induits en présence de NaBu ont été identifiés avec la banque de données "Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery" (DAVID).

Tableau 3
Liste des gènes induits par le NaBu

				PROCESSUS BIOLOGIQUES									
AUGMENTATION*	UNIQID	SYMBOLE	GÈNE	apoptose	réponse de défense	voie de signalisation couplée à la protéine-G	réponse inflammatoire	transport intracellulaire	transport des ions	phosphorylation	biosynthèse des protéines	catabolisme des protéines	cascade de protéines kinase
21,2	Hs.155597	DF	D component of complement (adipsin)	—	x	—	—	—	—	—	x	—	—
20,0	Hs.234775	NRTN	neurturin	—	—	—	—	—	—	—	—	x	—
15,6	Hs.410597	CIP29	cytokine induced protein 29 kDa	—	—	—	—	—	—	—	x	—	x
13,0	Hs.407015	DLX1	distal-less homeo box 1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	x
11,9	Hs.334873	CPM	carboxypeptidase M	—	—	—	—	—	—	—	x	—	—
11,5	Hs.132781	WSX1	interleukin 27 receptor, alpha	—	x	—	—	—	—	—	—	—	—
11,4	Hs.388726	RGS4	regulator of G-protein signalling 4	—	x	—	—	—	—	—	x	—	—
11,3	Hs.22785	GABRE	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, epsilon	—	x	—	x	—	—	—	—	—	—
11,1	Hs.409602	SULF1	sulfatase 1	x	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10,8	Hs.80642	STAT4	signal transducer and activator of transcription 4	—	—	—	—	—	—	—	x	x	—
10,2	Hs.158315	IL18RAP	interleukin 18 receptor accessory protein	—	x	—	x	—	—	—	—	—	—
9,9	Hs.248074	HOXA3	homeo box A3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	x
9,8	Hs.142255	IAPP	islet amyloid polypeptide	x	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9,7	Hs.254837	SLC2A4RG	SLC2A4 regulator	—	—	—	—	—	—	—	—	x	—
9,6	Hs.378208	LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	—	x	—	—	—	—	—	—	—	—
9,4	Hs.48714	AKAP5	A kinase (PRKA) anchor protein 5	—	—	—	x	—	—	—	—	—	—
9,3	Hs.280306	MLLT4	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia	—	—	x	—	—	—	—	—	—	—
9,3	Hs.315230	GC20	translation factor sui1 homolog	—	—	—	—	—	—	x	—	—	—
9,1	Hs.40510	SLC25A27	solute carrier family 25, member 27	—	—	—	x	—	—	—	—	—	—
8,8	Hs.148822	ADARB1	adenosine deaminase, RNA-specific, B1 (RED1 homolog rat)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	x
8,7	Hs.11962	BCLG	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator)	x	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8,7	Hs.24970	RAB39B	RAB39B, member RAS oncogene family	—	—	—	x	—	—	—	—	—	—
8,6	Hs.391392	ID4	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	—	—	—	—	—	—	—	—	x	—
8,6	Hs.137418	ABCC9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	—	—	—	x	—	—	—	—	—	—
8,5	Hs.279522	NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	—	—	—	—	—	—	—	—	x	—
8,4	Hs.8546	NOTCH3	Notch homolog 3 (Drosophila)	—	—	—	—	—	—	—	—	x	—
8,4	Hs.170053	GPR88	G-protein coupled receptor 88	—	x	—	—	—	—	—	—	—	—
8,3	Hs.1524	TNFSF9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	x	x	—	—	—	—	—	—	—	—
8,2	Hs.125902	USP2	ubiquitin specific protease 2	—	—	—	—	—	—	—	x	—	—
8,1	Hs.314623	BCL11A	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	—	—	—	—	—	—	—	—	x	—
8,1	Hs.511949	RRP4	homolog of Yeast RRP4 (ribosomal RNA processing 4), 3'-5'-exoribonuclease	—	—	—	—	—	—	—	—	—	x
7,5	Hs.7117	GRIA1	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1	—	—	—	—	x	—	—	—	—	—
7,4	Hs.276506	FYB	FYN binding protein (FYB-120/130)	—	x	—	x	x	—	—	x	—	—
7,4	Hs.269881	SNX13	sorting nexin 13	—	—	—	x	—	—	—	—	—	—
7,4	Hs.302690	NFIB	nuclear factor I/B	—	—	—	—	—	—	—	—	x	—
7,4	Hs.129700	TLL1	tolloid-like 1	—	—	—	—	—	—	—	x	—	—
6,9	Hs.435003	RCE1	RCE1 homolog, prenyl protein protease (S. cerevisiae)	—	—	—	—	—	—	—	x	—	—
6,8	Hs.144699	CPA5	carboxypeptidase A5	—	—	—	—	—	—	—	x	—	—
6,6	Hs.302161	EDG8	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8	—	x	—	—	—	—	—	—	—	—
6,5	Hs.289368	ADAM19	a disintegrin and metalloproteinase domain 19 (meltrin beta)	—	—	—	—	—	—	—	x	—	—
6,2	Hs.437691	ATP6V1E2	ATPase, H+ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E isoform 2	—	—	—	—	x	x	—	—	—	—
6,1	Hs.1349	CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	—	x	—	—	—	—	—	—	—	—
5,9	Hs.352241	TAS2R40	taste receptor, type 2, member 40	—	x	—	—	—	—	—	—	—	—
5,8	Hs.387648	AP1S3	adaptor-related protein complex 1, sigma 3 subunit	—	—	—	x	—	—	—	—	—	—
5,8	Hs.84063	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	x	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5,7	Hs.20521	HRMT1L2	HMT1 hnRNP methyltransferase-like 2 (S. cerevisiae)	—	x	—	—	—	—	—	—	—	—
5,7	Hs.89717	CPA2	carboxypeptidase A2 (pancreatic)	—	—	—	—	—	—	—	x	—	—
5,7	Hs.387871	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	x	x	—	—	—	—	—	—	—	—
5,7	Hs.512774	RASSF4	Ras association (RafGDS/AF-6) domain family 4	—	—	x	—	—	—	—	—	—	—
5,7	Hs.183123	NR5A2	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2	—	—	—	—	—	—	—	—	x	—
5,7	Hs.79564	NPAS1	neuronal PAS domain protein 1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	x
5,6	Hs.414880	F11R	F11 receptor	—	x	—	x	—	—	—	—	—	—
5,6	Hs.438040	MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	—	x	—	—	—	—	—	—	—	—
5,5	Hs.130489	ATP8A2	ATPase, aminophospholipid transporter-like, Class I, type 8A, member 2	—	—	—	—	x	—	—	—	—	—
5,3	Hs.308026	HLA-DRB3	major histocompatibility complex, class II, DR beta 3/4/5	—	x	—	—	—	—	—	—	—	—
5,3	Hs.413137	FXD2	FXD domain containing ion transport regulator 2	—	—	—	—	x	—	—	—	—	—
5,2	Hs.252550	KIAA0551	Traf2 and NCK interacting kinase	—	—	—	—	—	x	x	—	x	—
5,1	Hs.208229	GPR54	G protein-coupled receptor 54	—	x	—	—	—	—	—	—	—	—
5,1	Hs.198161	PLA2G4B	phospholipase A2, group IVB (cytosolic)	—	x	—	x	—	—	—	—	—	—

AUGMENTATION*: NaBu / contrôle, p < 0.05

Tableau 4. Liste des gènes de réponse de défense et de réponse inflammatoire réprimés plus de 2 fois par le NaBu. Analyse par micropuces d'ADN des gènes impliqués dans la réponse de défense et de réponse inflammatoire réprimés plus de 2 fois dans les cellules HIEC-6 traitées 8 heures avec le NaBu (NaBu/contrôle < 0.5). Les gènes impliqués dans les réponses de défense et d'inflammation ont été identifiés à l'aide de la banque de données "Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery" (DAVID).

Tableau 4

Liste des gènes de réponse de défense et de réponse inflammatoire réprimés plus de 2 fois par le NaBu

UNIQID	GÈNE	RÉPRESSION*
Hs.18858	phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent)	0,15
Hs.17681	toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein	0,15
Hs.367965	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 12	0,16
Hs.25413	toll interacting protein	0,21
Hs.301989	stabilin 1	0,22
Hs.397294	deoxynucleotidyltransferase, terminal	0,23
Hs.442787	zinc finger protein 148 (pHZ-52)	0,26
Hs.144946	protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator	0,34
Hs.436949	CD6 antigen	0,39
Hs.82359	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	0,42
Hs.167344	ferritin, heavy polypeptide 1	0,43

RÉPRESSION*: NaBu / contrôle, $p < 0.05$

Tableau 5. Liste des gènes de réponse de défense et de réponse inflammatoire induits plus de 2 fois par le NaBu. Analyse par micropuces d'ADN des gènes impliqués dans la réponse de défense et de réponse inflammatoire induits plus de 2 fois dans les cellules HIEC-6 traitées 8 heures avec le NaBu (NaBu/contrôle > 2). Les gènes impliqués dans les réponses de défense et d'inflammation ont été identifiés à l'aide de la banque de données "Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery" (DAVID).

Tableau 5

Liste des gènes de réponse de défense et de réponse inflammatoire induits plus de 2 fois par le NaBu

UNIQID	GÈNE	INDUCTION*
Hs.155597	D component of complement (adipsin)	21,19
Hs.132781	interleukin 27 receptor, alpha	11,46
Hs.158315	interleukin 18 receptor accessory protein	10,24
Hs.376208	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	9,61
Hs.1524	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	8,25
Hs.276506	FYN binding protein (FYB-120/130)	7,44
Hs.173730	Mediterranean fever	6,69
Hs.1349	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	6,12
Hs.20521	HMT1 hnRNP methyltransferase-like 2 (S. cerevisiae)	5,74
Hs.438040	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	5,62
Hs.198161	phospholipase A2, group IVB (cytosolic)	5,09
Hs.193418	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	4,32
Hs.181097	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 (tax-transcriptionally activated glycoprotein 1, 34kDa)	4,32
Hs.225946	chemokine (C-C motif) receptor 9	4,03
Hs.285401	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	3,96
Hs.76415	inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein)	3,95
Hs.1116	lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	3,88
Hs.375035	transcription elongation factor B polypeptide 3B (elongin A2)	3,88
Hs.77867	adenosine A1 receptor	3,87
Hs.414880	F11 receptor	3,82
Hs.110040	interleukin 17B	3,60
Hs.169824	killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1	3,54
Hs.1721	interleukin 11	3,52
Hs.142023	CD96 antigen	3,45
Hs.308026	major histocompatibility complex, class II, DR beta 3/4/5	3,42
Hs.212892	prolactin receptor	3,41
Hs.25647	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	3,23
Hs.82401	CD69 antigen (p60, early T-cell activation antigen)	3,08
Hs.89575	CD79B antigen (immunoglobulin-associated beta)	3,06
Hs.306230	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2/5	3,06
Hs.20315	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	2,83
Hs.169274	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	2,78
Hs.387871	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	2,73
Hs.75256	regulator of G-protein signalling 1	2,65
Hs.99029	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	2,60
Hs.79334	nuclear factor, interleukin 3 regulated	2,58
Hs.132794	phosphate cytidylyltransferase 1, choline, beta isoform	2,54
Hs.413924	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	2,53
Hs.103982	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	2,51
Hs.37035	homeo box HB9	2,47
Hs.351796	NADPH oxidase, EF hand calcium-binding domain 5	2,42
Hs.433445	jagged 2	2,39
Hs.80420	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	2,36
Hs.371264	SAM domain and HD domain 1	2,35
Hs.197029	adenosine A2a receptor	2,35
Hs.287797	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	2,34
Hs.75627	CD14 antigen	2,32
Hs.201300	cysteinyl leukotriene receptor 1	2,25
Hs.4257	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3	2,22
Hs.421194	tyrosylprotein sulfotransferase 1	2,22
Hs.408543	myelin basic protein	2,18
Hs.41682	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1	2,15
Hs.9028	histone deacetylase 5	2,14
Hs.407546	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	2,14
Hs.446375	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	2,13
Hs.511748	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semap)	2,12
Hs.82120	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	2,11
Hs.155024	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	2,06
Hs.375019	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 3/5	2,04

INDUCTION*: NaBu / contrôle, p < 0.05

les résultats obtenus par analyse RT-PCR (Fig. 18), nous avons pu établir qu'un ratio (NaBu+IL-1 β / IL-1 β) supérieur ou égale à 1.3 correspondait à un effet positif significatif du NaBu sur l'induction par l'IL-1 β , tandis qu'un ratio inférieur à 0.8 démontrait un effet négatif. Ainsi, nous avons déterminé que, parmi les gènes induits par l'IL-1 β , plus de 54% étaient affectés négativement par le NaBu et 21% avaient des niveaux d'expression augmentés en présence de NaBu (Tableaux 4 et 5).

La classification des gènes induits par l'IL-1 β selon le processus biologique dans lequel ils sont impliqués montre que plus de 31% des gènes induits identifiés faisaient partie de la réponse de défense et de la réponse inflammatoire. Le Tableau 6 montre cette catégorie de gènes, ainsi que l'effet du NaBu sur l'induction de ceux-ci par l'IL-1 β . Selon les critères établis précédemment, l'ajout du NaBu a diminué l'induction par l'IL-1 β de plus de 53% des gènes de réponse de défense et de réponse inflammatoire, augmenté les niveaux d'induction de 20% des gènes de cette classe, alors que les niveaux d'ARNm d'environ 27% des gènes n'étaient pas modifiés en présence de NaBu.

De plus, l'effet du NaBu sur l'expression des gènes de réponse de défense et de réponse inflammatoire semble dépendre du contexte cellulaire. En effet, au moins 9 gènes impliqués dans l'inflammation avaient des niveaux d'expression de base augmentés par le NaBu, alors que leurs niveaux d'expression induits par l'IL-1 étaient diminués par l'ajout de NaBu. Parmi ces gènes, on retrouve entre autres les chemokines (C-X-C motif) ligand 10 et ligand 11 (*CXCL10* et *CXCL11*) et le facteur de stimulation des colonies 2 (*CSF2*). Ces résultats démontrent donc le rôle anti-inflammatoire du NaBu, mais uniquement dans un contexte pro-inflammatoire. Cette régulation semble cibler des gènes

Tableau 6. Régulation des gènes impliqués dans la réponse de défense et de réponse inflammatoire par l'IL-1 β et le NaBu. Analyse par micropuces d'ADN des gènes de réponse de défense et de réponse inflammatoire induits plus de 2 fois dans les cellules HIEC-6 après 8 heures de traitement avec l'IL-1 β ou la combinaison d'IL-1 β et de NaBu. Les signaux émis dans trois différentes expériences ont été analysés avec le programme Affymetrix Microarray Suite 5.0 (MAS5) et exprimés sous forme de niveau d'induction par comparaison aux cellules non-traitées (contrôle). Les gènes impliqués dans les réponse de défense et d'inflammation ont été identifiés à l'aide de la banque de données "Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery" (DAVID).

Tableau 6

Régulation des gènes impliqués dans la réponse de défense et la réponse inflammatoire par l'IL-1 β et le NaBu

UNIQID	SYMBOLE	GÈNE	INDUCTION*		RATIO
			IL-1 β	NaBu IL-1 β	NaBu IL-1 β /IL-1 β
Hs.241570	TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	2,1	5,4	2,6
Hs.284394	C3	complement component 3	5,7	13,5	2,4
Hs.75256	RGS1	regulator of G-protein signalling 1	3,7	8,3	2,3
Hs.509513	NCR3	natural cytotoxicity triggering receptor 3	3,1	6,9	2,2
Hs.80420	CX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	3,8	7,4	1,9
Hs.1955	SAA2	serum amyloid A2	3,8	7,3	1,9
Hs.278388	ORM1	orosomucoid 1/orosomucoid 2	4,9	8,3	1,7
Hs.99029	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	3,1	5,1	1,7
Hs.87968	TLR9	toll-like receptor 9	2,1	3,5	1,7
Hs.193418	TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	2,4	3,8	1,6
Hs.424542	IRAK2	interleukin-1 receptor-associated kinase 2	12,4	18,3	1,5
Hs.437058	STAT5A	signal transducer and activator of transcription 5A	3,5	5,2	1,5
Hs.79197	CD83	CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	2,8	4,1	1,4
Hs.46348	BDKRB1	bradykinin receptor B1	3,7	4,9	1,3
Hs.386567	GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	3,2	4,1	1,3
Hs.99899	TNFSF7	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7	2,0	2,6	1,3
Hs.1722	IL1A	interleukin 1, alpha	7,5	9,4	1,3
Hs.79022	GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	4,4	5,4	1,2
Hs.727	INHBA	inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	4,8	5,6	1,2
Hs.75498	CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	96,0	113,3	1,2
Hs.80645	IRF1	interferon regulatory factor 1	2,6	3,0	1,2
Hs.386467	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54) human rhinovirus receptor	18,7	20,9	1,1
Hs.1101	POU2F2	POU domain, class 2, transcription factor 2	4,3	4,6	1,1
Hs.131328	NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	9,1	9,1	1,0
Hs.241535	APOL3	apolipoprotein L 3	4,2	4,0	1,0
Hs.2050	PTX3	pentaxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	5,2	5,0	1,0
Hs.62661	GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	2,2	2,1	0,9
Hs.624	IL8	interleukin 8	3,3	3,1	0,9
Hs.18063	ETS1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	2,5	2,3	0,9
Hs.789	CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	9,2	8,4	0,9
Hs.512234	IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	15,0	13,5	0,9
Hs.75765	CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	26,6	23,7	0,9
Hs.71968	IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	4,1	3,6	0,9
Hs.168132	IL15	interleukin 15	4,3	3,4	0,8
Hs.250882	BDKRB2	bradykinin receptor B2	4,4	3,5	0,8
Hs.83795	IRF2	interferon regulatory factor 2	2,7	2,1	0,8
Hs.512211	IFNAR2	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	3,8	2,9	0,8
Hs.1721	IL11	interleukin 11	4,2	3,2	0,8
Hs.241382	TNFSF15	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	4,4	3,4	0,8
Hs.443271	PDCD1LG1	programmed cell death 1 ligand 1	2,9	2,2	0,8
Hs.103755	RIPK2	receptor-interacting serine-threonine kinase 2	6,3	4,8	0,8
Hs.199248	PTGER4	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	2,2	1,7	0,7
Hs.1802	HLA-DOB	major histocompatibility complex, class II, DO beta	5,0	3,6	0,7
Hs.164021	CXCL6	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	37,8	27,2	0,7
Hs.48516	B2M	beta-2-microglobulin	2,6	1,8	0,7
Hs.381058	CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	2,6	1,7	0,7
Hs.14453	ICSBP1	interferon consensus sequence binding protein 1	2,4	1,6	0,7
Hs.159301	IL18R1	interleukin 18 receptor 1	8,4	5,6	0,7
Hs.321045	IKBKE	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon	2,7	1,8	0,7
Hs.75626	CD58	CD58 antigen, (lymphocyte function-associated antigen 3)	2,1	1,3	0,6
Hs.407546	TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	51,6	31,8	0,6
Hs.352018	TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	2,4	1,4	0,6
Hs.840	INDO	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	6,5	3,9	0,6
Hs.197029	ADORA2A	adenosine A2a receptor	31,0	17,9	0,6
Hs.89714	CXCL5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	40,9	23,3	0,6
Hs.438040	MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	12,4	6,8	0,5
Hs.69771	BF	B-factor, properdin	13,8	7,4	0,5
Hs.81134	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	2,6	1,4	0,5
Hs.413924	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	49,7	25,6	0,5
Hs.50842	IFI35	interferon-induced protein 35	2,8	1,4	0,5
Hs.371264	SAMHD1	SAM domain and HD domain 1	5,6	2,7	0,5
Hs.252839	IFIT5	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	2,4	1,2	0,5
Hs.181874	IFIT4	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4	6,7	2,9	0,4
Hs.362807	IL7R	interleukin 7 receptor	2,7	1,1	0,4
Hs.129895	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	3,6	1,5	0,4
Hs.409925	GBP4	guanylate binding protein 4	6,1	2,5	0,4
Hs.278613	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	3,6	1,5	0,4
Hs.262150	CD22	CD22 antigen	11,4	4,4	0,4
Hs.20315	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	9,7	3,5	0,4
Hs.118633	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	5,0	1,8	0,4
Hs.489044	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	11,1	3,6	0,3
Hs.27954	CD86	CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen)	3,2	1,0	0,3
Hs.166120	IRF7	interferon regulatory factor 7	3,2	1,0	0,3
Hs.196384	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	29,6	9,1	0,3
Hs.310512	CCRL1	chemokine (C-C motif) receptor-like 1	2,3	0,7	0,3
Hs.159483	CIAS1	cold autoinflammatory syndrome 1	3,7	1,1	0,3
Hs.126256	IL1B	interleukin 1, beta	17,4	4,9	0,3
Hs.1349	CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	136,4	36,9	0,3
Hs.169274	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	12,0	3,2	0,3
Hs.1706	ISGF3G	interferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48kDa	3,0	0,7	0,2
Hs.103982	CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	78,4	18,4	0,2
Hs.72927	IL7	interleukin 7	8,8	2,0	0,2
Hs.926	MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	6,9	1,2	0,2
Hs.82316	IFI44	interferon-induced protein 44	7,5	1,2	0,2
Hs.270737	TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	5,9	0,9	0,2
Hs.414332	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	7,9	1,1	0,1
Hs.442936	OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	24,3	3,2	0,1
Hs.181301	CTSS	cathepsin S	15,6	1,8	0,1

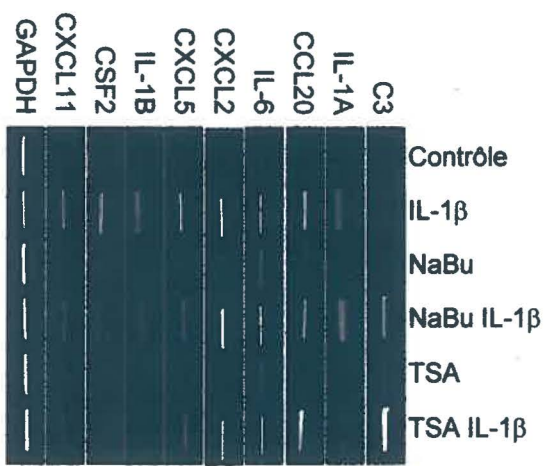
INDUCTION*: cellules traitées / cellules non-traitées, p < 0,05

précis, puisque d'autres gènes de réponse inflammatoire sont régulés différemment par le NaBu.

Certains des résultats obtenus par micropuces à ADN et montrés au Tableau 6 ont été validés par RT-PCR semi-quantitatifs, en sélectionnant au hasard une série de gènes de réponse inflammatoire importants et différemment affectés par le NaBu dans l'étude par micropuces (Fig. 18). La quantification des résultats obtenus a été effectuée par densitométrie et a confirmé les observations faites à partir des résultats obtenus par micropuces d'ADN. En effet, le NaBu semble encore une fois moduler spécifiquement l'expression de différents gènes induits par l'IL-1 β , augmentant les niveaux d'expression des gènes *C3* et *IL-1 α* , diminuant les niveaux d'expression des gènes *CXCL5*, *IL-1 β* , *CSF2* et *CXCL11*, et n'affectant pas significativement l'expression de *CCL20*, *IL-6* et *CXCL2*. De façon générale, l'effet du NaBu sur l'induction des gènes de réponse inflammatoire a été reproduit par le TSA, suggérant ainsi l'implication de l'activité des désacétylases dans cette régulation. Cependant, l'ajout de TSA a réduit l'induction du gène de l'interleukine 1 alpha (*IL-1 α*), contrairement au NaBu qui l'augmentait. Ainsi, la régulation de l'expression du gène *IL-1 α* par le NaBu pourrait faire intervenir d'autres mécanismes.

Figure 18. Régulation différentielle de l'expression des gènes de réponse inflammatoire par le butyrate. (A) L'ARN total a été isolé des cellules HIEC-6 traitées pendant 8 heures avec l'IL-1 β (10 ng/ml), le NaBu (5 mM) et le TSA (1 μ g/ml), seuls ou en combinaison. L'ADNc produit par transcriptase reverse à l'aide d'oligo(dT) a été amplifié par PCR avec les amorces pour les gènes IL-1 α , IL-1 β , IL-6, CXCL2, CXCL5, CXCL11, CCL20, CSF2 et C3. La quantité d'ADNc produit a été vérifiée par amplification de l'ARNm de GAPDH. Les produits d'amplification par PCR ont été séparés sur gel d'agarose 1% et visualisés par coloration au bromure d'éthidium. **(B)** Les produits PCR ont été quantifiés par densitométrie à l'aide du logiciel ImageQuant. Les résultats sont représentatifs de deux expériences.

A-



B-

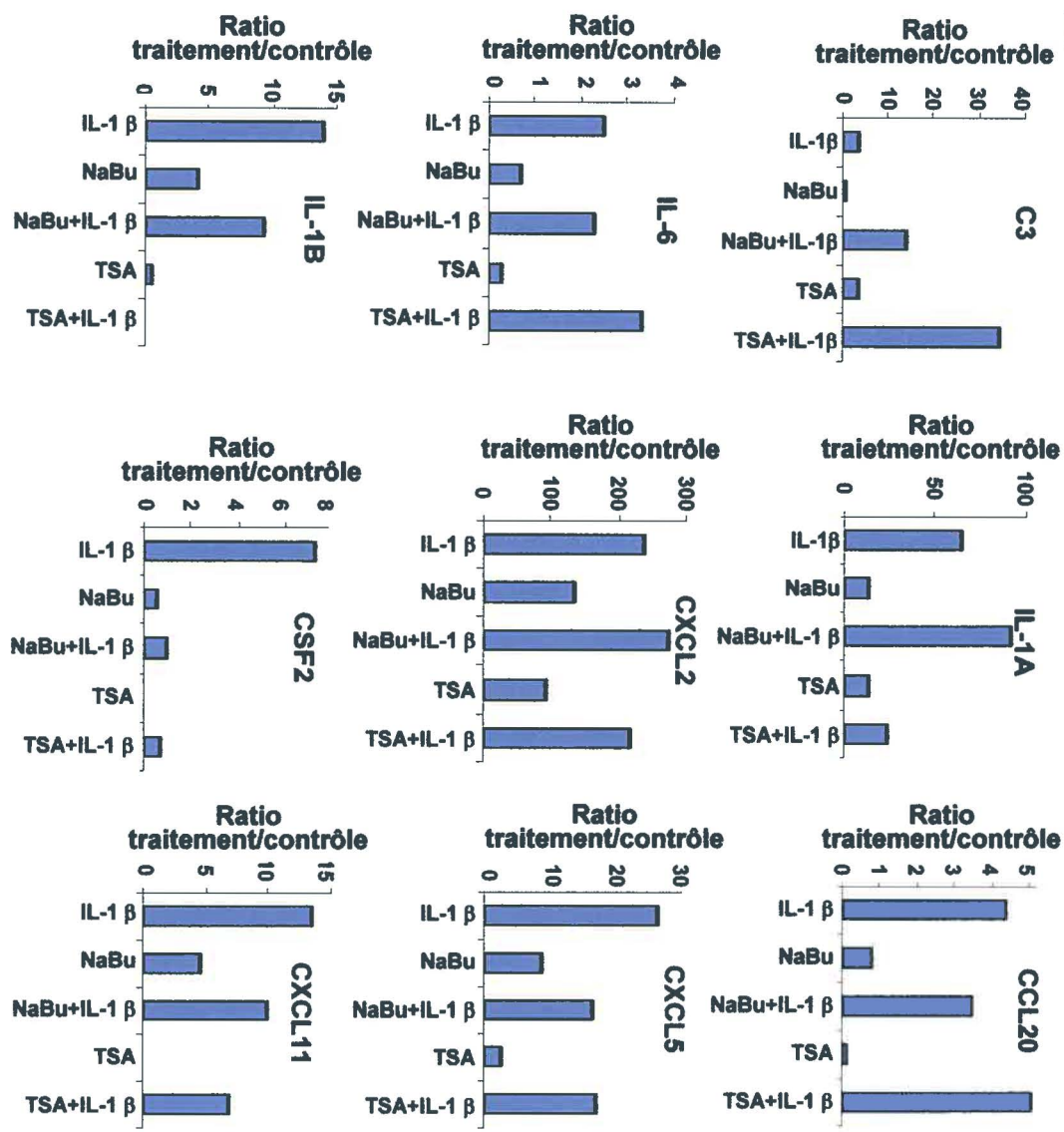


Figure 18

3- Modulation de l'expression des désacétylases dans les cellules intestinales épithéliales et rôle des désacétylases dans la régulation de l'expression de gènes de réponse inflammatoire.

3.1. Les niveaux d'acétylation induits sur les histones par les inhibiteurs de désacétylases sont maintenus uniquement dans les cellules Caco-2/15 prolifératives.

Afin de vérifier si l'état de prolifération et de différenciation cellulaire pouvait affecter les niveaux d'acétylation des histones, nous avons traité les cellules Caco-2/15 sous-confluentes et post-confluentes avec les inhibiteurs de désacétylases pendant différents temps. Les niveaux d'acétylation sur les histones ont été mesurés par buvardage Western à l'aide d'un anticorps anti-lysine-acétylée. Dans les cellules sous-confluentes, les niveaux d'acétylation sur les histones H3 et H4 ont été induits après deux heures de traitement avec les inhibiteurs de désacétylases, et ces niveaux ont augmenté graduellement jusqu'à 24 heures de traitement (Fig. 19). Les niveaux d'acétylation sur les histones des cellules 3 jours post-confluentes (Fig. 19) et 15 jours post-confluentes (non-montré) ont également été induits rapidement en présence d'inhibiteurs de désacétylases, mais ces niveaux n'ont pas été maintenus après 24 heures. Ainsi, l'arrêt de prolifération et l'induction des processus de différenciation cellulaire après l'atteinte de la confluence des cellules Caco-2/15 semble avoir un impact négatif sur le maintien des niveaux globaux d'acétylation sur les histones.

3.2. Les niveaux globaux d'acétylation sont diminués dans les cellules de la villosité de l'épithélium intestinal.

Nous avons voulu vérifier si les niveaux globaux d'acétylation étaient modulés par l'état de prolifération et de différenciation cellulaire dans les cellules intestinales épithéliales *in*

Figure 19. Régulation de l'induction des niveaux d'acétylation sur les histones induits par l'état de prolifération et de différenciation cellulaire des cellules Caco-2/15. Les cellules Caco-2/15 sous-confluentes (**A**) et 3 jours post-confluentes (**B**) ont été traitées pendant 1, 2, 4, 8, 12 et 24 heures avec le NaBu (5 mM) ou le TSA (1 µg/ml). Les histones isolées ont été séparées sur gel d'acrylamide SDS-PAGE 15%, transférées sur membrane PVDF puis analysées par buvardage Western à l'aide d'un anticorps anti-lysine-acétylée. Les histones provenant de cellules non-traitées ont été utilisées comme contrôle et la quantité de protéines a été vérifiée par coloration au Rouge Ponceau.

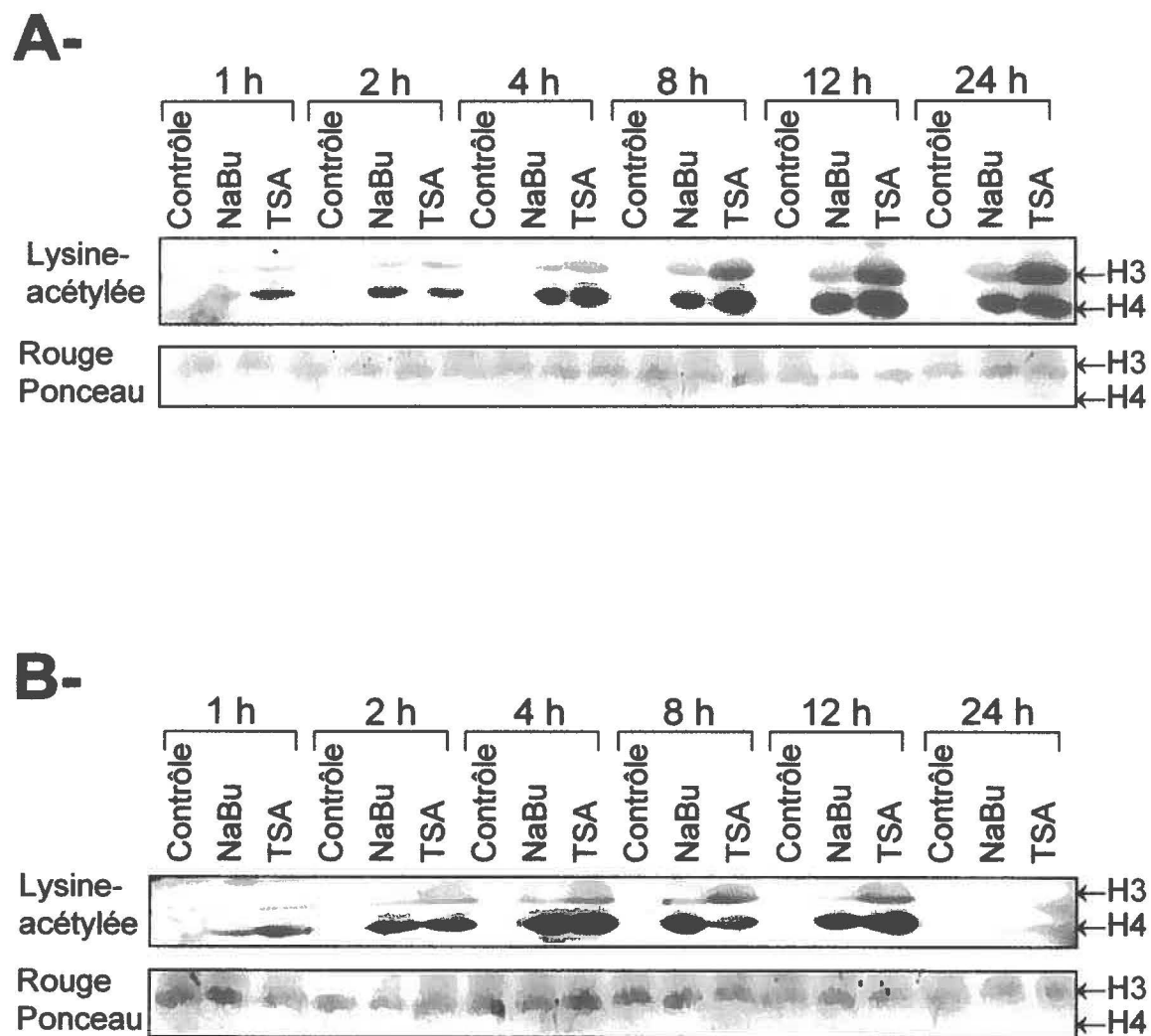


Figure 19

vivo. Par immunofluorescence avec un anticorps anti-lysine-acétylée, nous avons détecté les niveaux d'acétylation le long de l'axe crypte/villosité sur une coupe de jéjunum humain fœtal. Dans les cellules de la crypte, correspondant aux cellules prolifératives non-différenciées, les niveaux d'acétylation nucléaires étaient relativement élevés alors que dans les cellules de la villosité, correspondant aux cellules matures non-prolifératives, les niveaux d'acétylation étaient significativement réduits (Fig. 20). Ces résultats suggèrent donc également une régulation négative des niveaux globaux d'acétylation par l'arrêt de prolifération et la différenciation cellulaire.

3.3. L'expression des désacétylases HDAC1 et HDAC3 est plus élevée dans les cellules de la crypte de l'épithélium intestinal.

Les niveaux d'acétylation cellulaires dépendent de la balance entre l'activité des acétylases et des désacétylases. Ainsi, les niveaux d'expression des désacétylases peuvent avoir un impact important sur l'acétylation globale. Par immunofluorescence, nous avons donc évalué l'expression des HDACs 1, 3, 4 et 6 le long de l'axe crypte-villosité du jéjunum humain fœtal. L'expression de HDAC1 et de HDAC3 a été observée principalement au niveau du noyau des cellules de la crypte, et de façon moins importante dans le noyau des cellules de la villosité (Fig. 21). HDAC3 était également nucléaire, mais sa présence était plus importante dans les cellules de la crypte. Finalement, les HDACs 4 et 6 n'ont pas pu être détectées lors de cette expérience. Ces résultats suggèrent donc une diminution de l'expression de HDAC1 et de HDAC3 dans les cellules intestinales différenciées non-prolifératives.

Figure 20. Modulation des niveaux d'acétylation dans l'axe crypte-villosité du jéjunum fœtal humain. Les immunofluorescences ont été effectuées sur des coupes de jéjunum fœtal humain. Les coupes de tissus fixées sur lamelles ont été incubées sans anticorps (contrôle) ou avec l'anticorps anti-lysine-acétylée de lapin, suivi d'un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué à la fluorescéine isothiocyanate (FITC). Les niveaux d'acétylation ont été observés par microscopie à fluorescence.

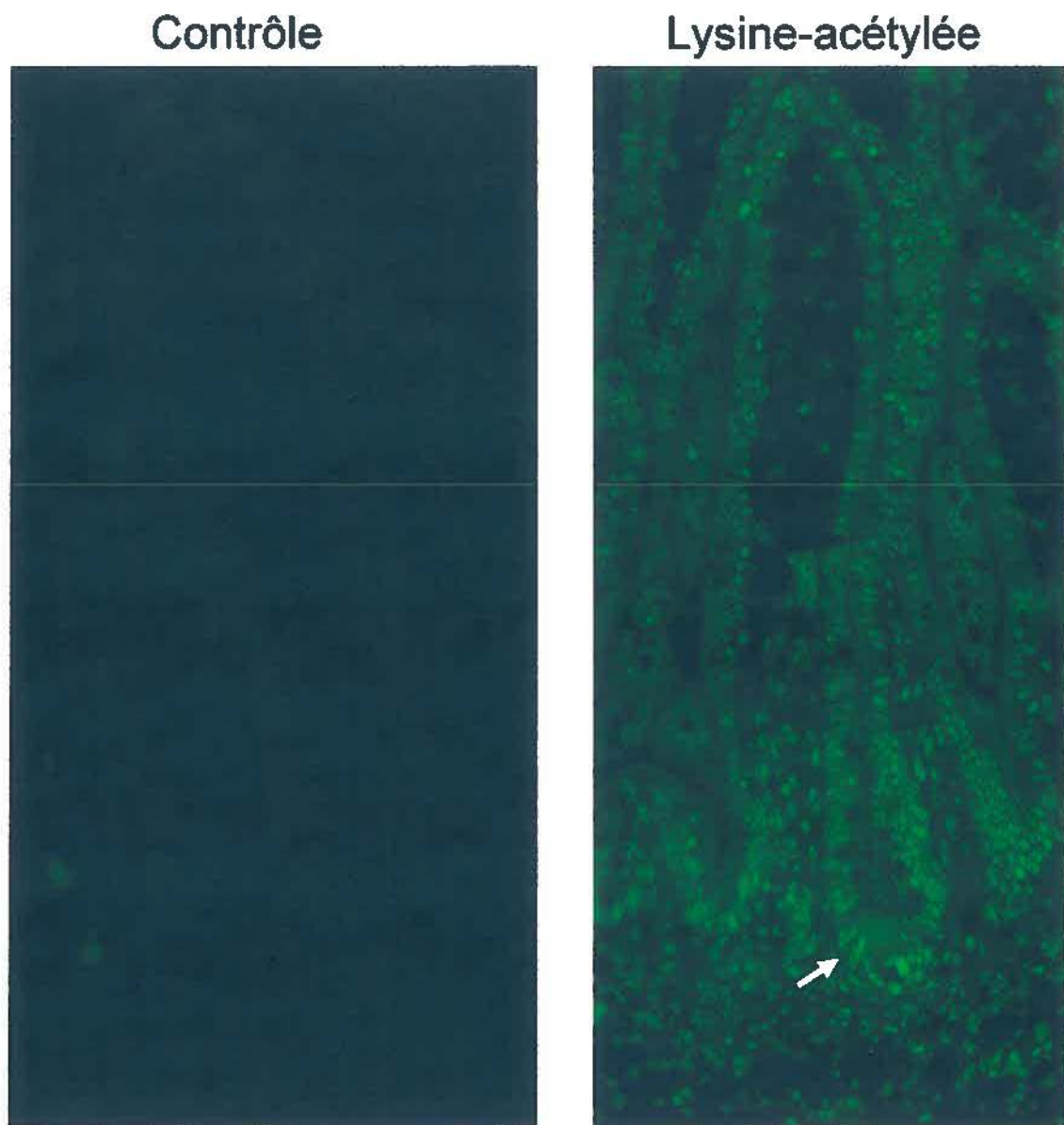


Figure 20

Figure 21. Régulation de l'expression des HDACs 1, 3, 4 et 6 au niveau de l'axe crypte-villosité du jéjunum fœtal humain. Les immunofluorescences ont été effectuées sur des coupes de jéjunum fœtal humain, fixées sur lames et incubées sans anticorps (contrôle) ou avec les anticorps de lapin anti-HDAC1, anti-HDAC3, anti-HDAC4 et anti-HDAC6. Finalement, les lames ont été incubées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué à la fluorescéine isothiocyanate (FITC), et les niveaux d'expression des HDACs dans les cellules épithéliales ont été détectés par microscopie à fluorescence.

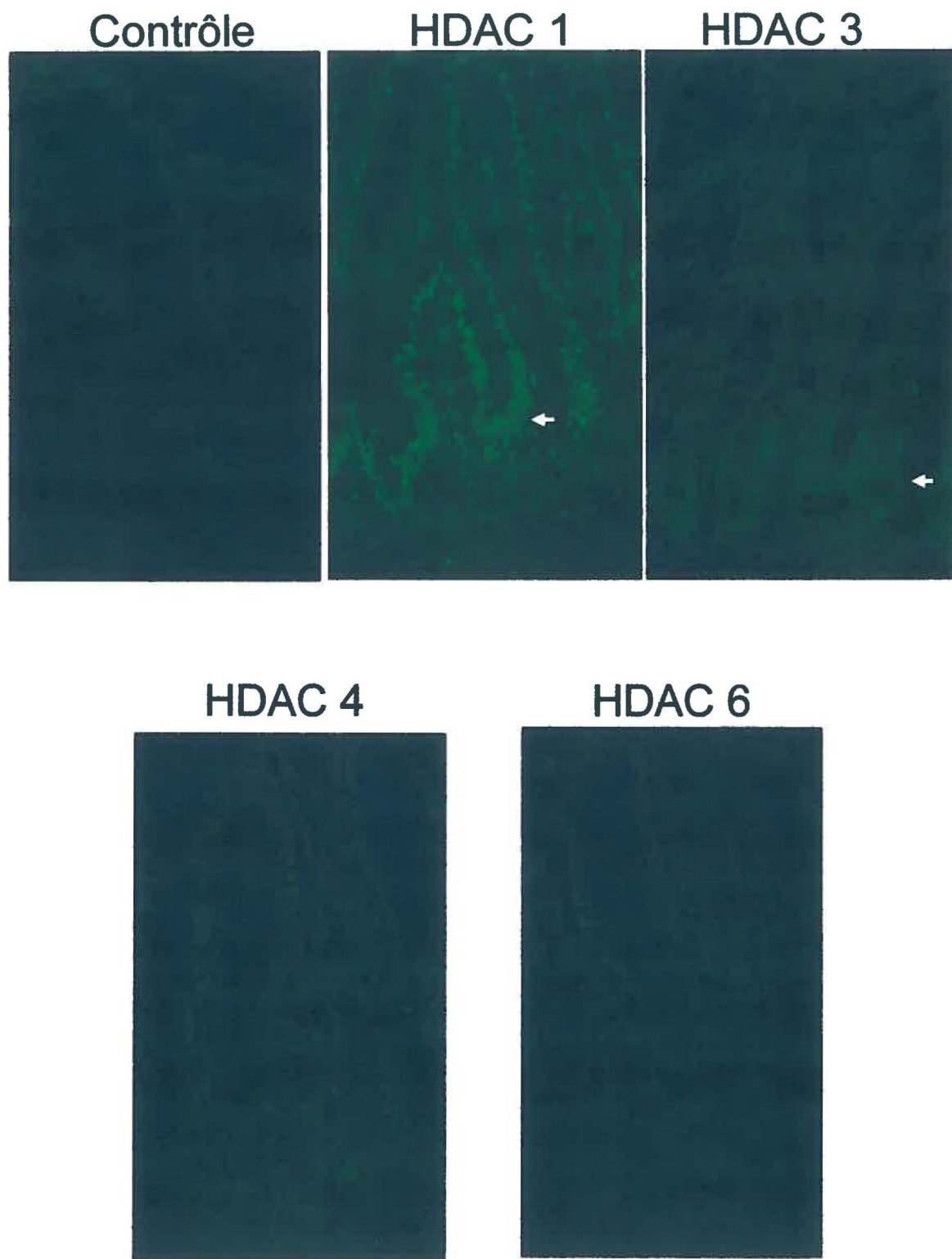


Figure 21

3.4. Les niveaux d'expression des HDACs 3, 4 et 6 sont diminués graduellement après l'atteinte de la confluence des cellules Caco-2/15.

Nous avons également évalué la régulation de l'expression des désacétylases par l'état de prolifération et de différenciation cellulaire des cellules Caco-2/15. Les niveaux d'expression nucléaire des HDACs 1, 3, 4 et 6 ont été évalués par buvardage Western dans les cellules Caco-2/15 sous-confluentes, confluentes ou 5, 10 et 15 jours après la confluence (Fig. 22). Alors que l'expression de HDAC1 n'a pas été modulée par la confluence des cellules, les niveaux d'expression des HDACs 3, 4 et 6 ont été graduellement diminués dans les cellules post-confluentes. Ainsi, l'arrêt de prolifération et l'induction des processus de différenciation cellulaire semblent affecter négativement et de façon spécifique l'expression des HDACs 3, 4 et 6.

3.5. La surexpression des HDACs 3 et 4 réduit significativement les niveaux d'expression de base d'IL-8luc.

Nous avons démontré que l'inhibition de l'activité des désacétylases pouvait affecter spécifiquement la régulation de l'expression de gènes de réponse inflammatoire. Afin de déterminer le rôle précis des désacétylases au niveau de cette régulation, nous avons transfecté transitoirement les cellules Caco-2/15 sous-confluentes avec les vecteurs d'expression des HDACs 1, 3, 4 et 6 et vérifié l'impact de la surexpression sur la régulation transcriptionnelle de base des promoteurs SAA2 et IL-8 par essais luciférase. L'activité transcriptionnelle de base sur le promoteur de SAA2 n'a pas été affectée par la surexpression des différentes HDACs (Fig. 23). Cependant, la surexpression des HDACs 1 et 6 a réduit faiblement l'activité transcriptionnelle de base

Figure 22. Expression des HDACs 1, 3, 4 et 6 dans les Caco-2/15 prolifératives et en différenciation. Les protéines nucléaires ont été isolées des cellules Caco-2/15 sous-confluentes (sous-confluent), confluentes (confluent), et 5, 10 ou 15 jours post-confluentes (P-C). Les protéines isolées ont été séparées sur gel d'acrylamide SDS-PAGE 10%, transférées sur membrane PVDF puis analysées par buvardage Western avec les anticorps contre HDAC1, HDAC3, HDAC4 et HDAC6. L'hybridation avec l'anticorps anti-lamineB a été utilisée pour évaluer les niveaux de protéines dans chaque puits.

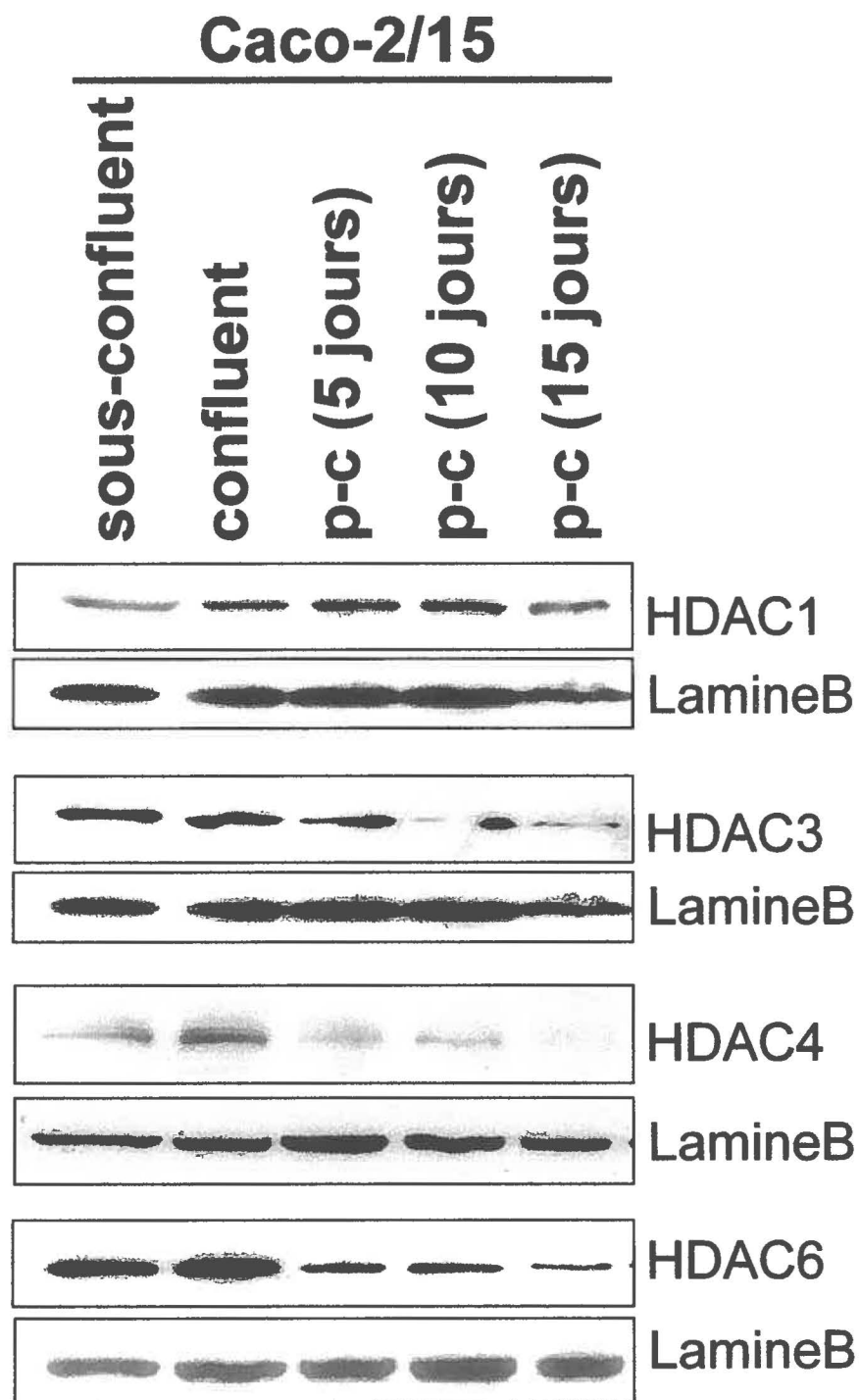
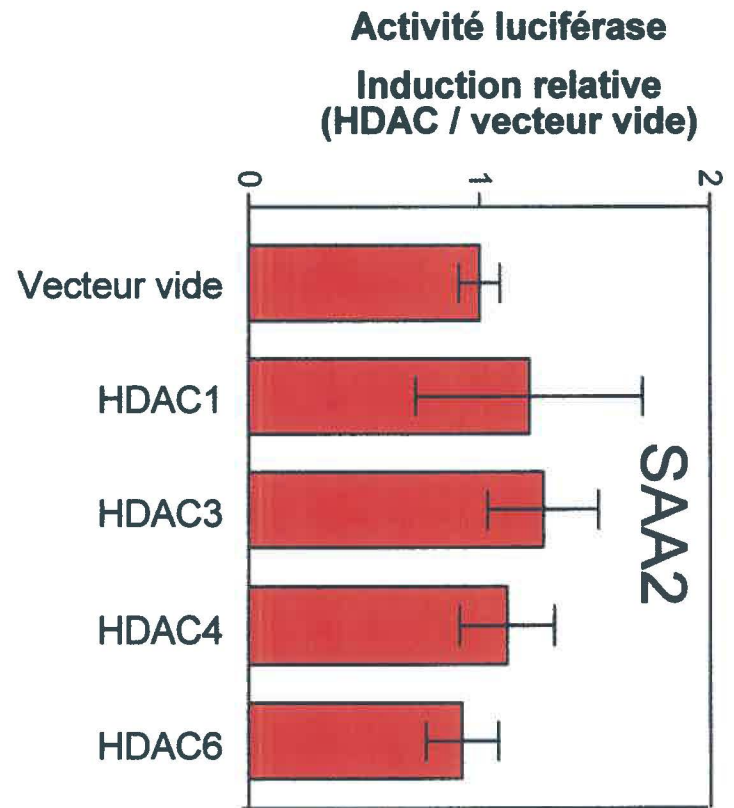
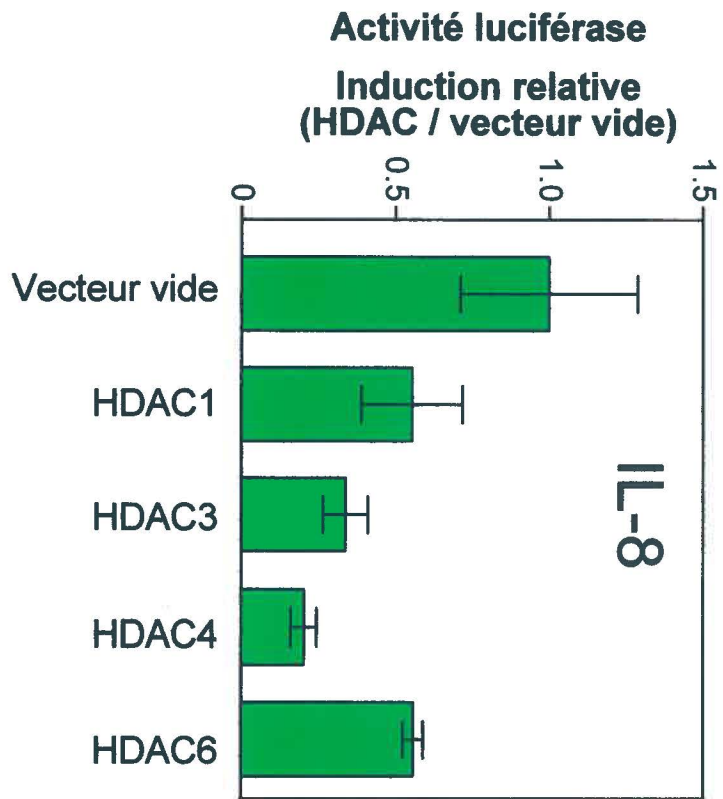


Figure 22

Figure 23. Rôle des HDACs 1, 3, 4 et 6 dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de base des promoteurs SAA2 et IL-8. Les cellules Caco-2/15 sous-confluentes (S-C) ont été transfectées transitoirement avec les constructions SAA2-luc et IL-8luc, en combinaison avec un vecteur vide ou les vecteurs d'expression des HDAC 1, 3, 4 et 6. Les niveaux d'induction ont été déterminés par comparaison avec l'activité luciférase présente dans les cellules transfectées avec le vecteur vide. Les barres d'erreur ont été évaluées en fonction de la déviation standard de quatre expériences indépendantes représentatives effectuées en triplicata.

Figure 23



du promoteur IL-8, alors que la surexpression des HDACs 3 et 4 a significativement réduit les niveaux d'expression de IL-8luc. Ces résultats démontrent donc que les HDACs 1, 3, 4 et 6 modulent négativement et de façon spécifique l'activité transcriptionnelle basale du promoteur de l'IL-8.

3.6. L'induction de l'activité transcriptionnelle du promoteur de SAA2 est réduite par la surexpression des HDACs 1, 3 et 4.

L'ensemble des résultats obtenus dans les deux premières parties de cette thèse a indiqué l'importance du contexte cellulaire au niveau de l'effet des inhibiteurs de désacétylases sur l'expression des gènes de réponse inflammatoire. Nous avons donc voulu vérifier l'effet de la surexpression des HDACs 1, 3, 4 et 6 au niveau de l'induction de l'activité transcriptionnelle des promoteurs de SAA2 et de IL-8 par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases. Les cellules Caco-2/15 sous-confluentes ont été transfectées transitoirement avec les constructions SAA2luc et IL-8luc en présence des vecteurs d'expression des HDACs 1, 3, 4 et 6 ou d'un vecteur vide. Par la suite, les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec l'IL-1 β , le NaBu et le TSA, seuls ou en combinaison. Afin d'éliminer l'effet de la surexpression des HDACs sur les niveaux d'activité transcriptionnelle de base des promoteurs, les données obtenues à la suite de la surexpression de chaque HDAC ont été analysées indépendamment en fonction de l'activité luciférase dans les cellules non-traitées (contrôle = 1). Les résultats obtenus par essais luciférase ont démontré principalement que la surexpression des HDACs 1, 3 et 4 peut diminuer considérablement la synergie entre l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases au niveau de l'induction de l'activité transcriptionnelle du promoteur SAA2

(Fig. 24). Cette diminution est également perceptible sur les niveaux de SAA2luc induits par le TSA uniquement. De façon générale, les niveaux d'induction de IL-8luc n'ont pas été affectés significativement par la surexpression des HDACs. Ces résultats démontrent donc que la régulation des gènes de réponse inflammatoire *SAA2* et *IL-8* par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases implique l'activité de HDACs spécifiques dont l'activité transcriptionnelle varie en fonction du gène cible et du contexte cellulaire.

Figure 24. Implication des HDACs 1, 3, 4 et 6 au niveau de la régulation de l'activité transcriptionnelle sur les promoteurs SAA2 et IL-8 induits par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases. Les transfections transitoires ont été effectuées dans les cellules Caco-2/15 sous-confluentes avec les constructions SAA2-luc et IL-8luc, en combinaison avec un vecteur vide ou les vecteurs d'expression des HDAC 1, 3, 4 et 6. Par la suite, les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec l'IL-1 β (10 ng/ml), le NaBu (5 mM) et le TSA (1 μ g/ml), seuls ou en combinaison. Les niveaux d'induction ont été déterminés par comparaison avec l'activité luciférase présente dans les cellules non-traitées respectives. Les barres d'erreur ont été évaluées en fonction de la déviation standard de quatre expériences indépendantes représentatives effectuées en triplicata.

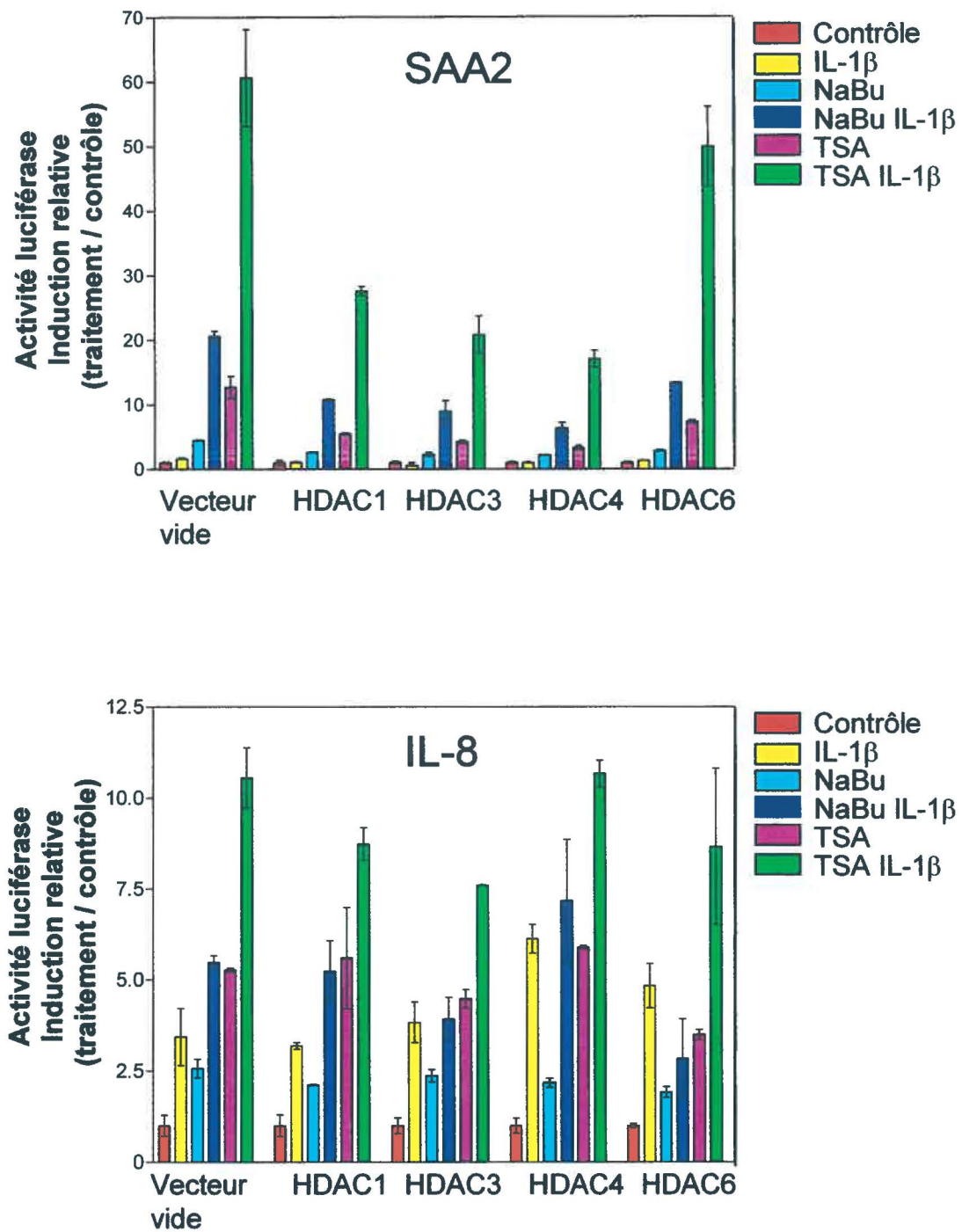


Figure 24

DISCUSSION

1- ACTIVATION SYNERGIQUE SPÉCIFIQUE DU PROMOTEUR DU GÈNE SÉRUM AMYLOÏDE A2 (SAA2) PAR L'IL-1 β ET LES INHIBITEURS DE DÉSACÉTYLASES.

Dans la première partie de cette thèse, nous démontrons qu'il existe une synergie entre l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases au niveau de l'induction de l'expression du gène de réponse inflammatoire *SAA2* dans les cellules de carcinome de côlon humain Caco-2/15. Cette synergie est spécifique puisque les inhibiteurs de désacétylases modulent l'expression du gène de réponse inflammatoire *IL-8* différemment en permettant plutôt le maintien transitoire des niveaux d'ARNm induits par l'IL-1 β . Selon les résultats obtenus avec le butyrate, la régulation de *SAA2* et de *IL-8* par l'inhibition des désacétylases pourrait être la conséquence de modifications analogues et complémentaires apportées de façon spécifique sur les promoteurs par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases, incluant l'acétylation sur les histones H3 et H4 ainsi que le recrutement des facteurs de transcription C/EBP et NF- κ B. Les changements apportés au promoteur *SAA2* par l'IL-1 β et le butyrate pourraient donc indépendamment préparer le promoteur à une éventuelle activation, tandis que ceux apportés au promoteur de l'IL-8 par le butyrate permettraient plutôt un maintien transitoire des modifications apportées par l'IL-1 β .

Plusieurs études ont démontré que l'expression du gène *SAA2* pouvait être induite de façon synergique par la combinaison de cytokines pro-inflammatoires dans différents types cellulaires (Thorn *et al.*, 2004; Hagihara *et al.*, 2004), dont les cellules épithéliales intestinales (Vreugdenhil *et al.*, 1999). Nos résultats montrent qu'il existe également une

synergie entre les inhibiteurs de désacétylases et la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β au niveau de l'expression du gène *SAA2* et ce, en fonction du contexte cellulaire. En effet, dans les cellules Caco-2/15 sous-confluentes, l'induction complète de l'expression de *SAA2* requiert à la fois la présence d'IL-1 β et d'inhibiteurs de désacétylases, tandis qu'un traitement à l'IL-1 β est suffisant pour induire rapidement les niveaux d'ARNm de *SAA2* dans les cellules post-confluentes. Cette hausse de sensibilité à l'IL-1 β dans les cellules Caco-2/15 post-confluentes pourrait être expliquée entre autres par l'augmentation à l'atteinte de la confluence de l'activité de la p38 MAPK, une des voies de signalisation induites par l'IL-1 β (Houde *et al.*, 2001). Par exemple, l'activation de la p38 MAPK à la suite de stimuli pro-inflammatoires induit rapidement et transitoirement la phosphorylation de l'histone H3 sur une sélection de promoteurs contenant des sites de liaison à l'ADN de NF- κ B, augmentant ainsi l'accessibilité de l'ADN et permettant l'induction de l'expression des gènes cibles (Saccani *et al.*, 2002). Ainsi, la hausse de l'activité de p38 MAPK dans les cellules post-confluentes pourrait augmenter l'accessibilité du site de liaison à l'ADN de NF- κ B présent sur le promoteur *SAA2*, facilitant l'activation transcriptionnelle de ce gène par l'IL-1 β . Nos résultats dans les cellules post-confluentes démontrent également un rôle biphasique joué par les inhibiteurs de désacétylases, réprimant initialement les niveaux d'ARNm de *SAA2* induits par l'IL-1 β , mais permettant le maintien et l'augmentation à long terme des niveaux induits par l'IL-1 β . Cette régulation différentielle pourrait découler de différentes modifications sur la chromatine en fonction du contexte cellulaire.

La régulation de l'expression de l'IL-8 peut se faire à différents niveaux, soit par la dérégulation sur le promoteur, l'activation transcriptionnelle du gène par les voies de signalisation NF- κ B et JNK, et finalement par la stabilisation de l'ARNm par la voie de signalisation p38 MAPK (Parhar *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003; Jijon *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2002). Différentes études effectuées dans les cellules Caco-2/15 ont démontré que les inhibiteurs de désacétylases pouvaient moduler l'expression du gène *IL-8* soit de façon positive (Fusunyan *et al.*, 1998) ou négative (Huang *et al.*, 1997), mais les mécanismes impliqués dans cette régulation restent à être précisés. Dans notre étude, nous avons observé un maintien transitoire des niveaux d'expression de l'IL-8 induits par l'IL-1 β dans les cellules Caco-2/15 traitées avec les inhibiteurs de désacétylases. Ainsi, l'inhibition des désacétylases pourrait affecter l'expression du gène *IL-8* en permettant le maintien de l'activation transcriptionnelle sur le promoteur par l'IL-1 β ou en augmentant la stabilité de l'ARNm de l'IL-8.

L'activation de la voie p38 MAPK par l'IL-1 β pourrait donc jouer un rôle important au niveau de la synergie observée sur l'expression du gène *SAA2* par les inhibiteurs de désacétylases et l'IL-1 β , ainsi que sur le maintien transitoire des niveaux d'ARNm de l'IL-8 induits par l'IL-1 β . D'ailleurs, l'ajout de l'inhibiteur de p38 MAPK SB203580 diminue les niveaux d'induction de *SAA2* (non-montré). Cependant, les inhibiteurs de désacétylases n'augmentent pas à court terme l'activité de p38 MAPK (non-montré). De plus, l'analyse par RT-PCR semi-quantitatif de l'expression des récepteurs de l'IL-1 β , soit IL-1RI et IL-1RII, n'a démontré aucune modification par les inhibiteurs de désacétylases et l'IL-1 β (non-montré). Ainsi, tout semble indiquer que l'induction de

l'expression du gène *SAA2* et le maintien transitoire des niveaux d'ARNm de l'IL-8 par les inhibiteurs de désacétylases n'est pas la conséquence d'un effet direct sur l'induction de la voie de signalisation p38 MAPK par l'IL-1 β .

Les résultats obtenus par transfections transitoires nous indiquent que la régulation de *SAA2* par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases se fait au niveau transcriptionnel. En effet, la mutation du site de liaison à l'ADN des C/EBPs sur le promoteur *SAA2* diminue de façon importante l'induction par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases, tandis que la mutation du site de liaison de NF- κ B abolit toute activité transcriptionnelle sur le promoteur. Ces résultats démontrent donc l'importance de ces sites sur le promoteur pour l'induction synergique de *SAA2* par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases. Également, les résultats obtenus par gels de rétention montrent que les inhibiteurs de désacétylases n'altèrent pas l'induction de l'activité de liaison à l'ADN des complexes NF- κ B dans les cellules Caco-2/15. Cependant, les changements induits par l'IL-1 β au niveau de l'expression et de la liaison à l'ADN des C/EBPs, soient la diminution de l'isoforme C/EBP α et l'augmentation de l'isoforme C/EBP δ , sont rétablies en présence d'inhibiteurs de désacétylases. Ainsi, aucune corrélation ne peut être faite entre l'activité de liaison à l'ADN *in vitro* des complexes NF- κ B et C/EBP par rapport à l'induction synergique de *SAA2* par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases.

Nous avons également démontré que les inhibiteurs de désacétylases induisent l'expression de *SAA2* après une préincubation de 4 heures avec l'IL-1 β . Inversement, l'IL-1 β peut aussi induire les niveaux d'ARNm de *SAA2* après une préincubation avec

les inhibiteurs de désacétylases, même si l'hyperacétylation globale des histones est rapidement renversée après le retrait de butyrate ou du TSA. Il est possible qu'un prétraitement avec l'IL-1 β permette la stimulation du promoteur SAA2 par le butyrate ou le TSA en modulant l'activité de la p38 MAPK, induisant la phosphorylation des facteurs de transcription NF- κ B et C/EBP et modifiant leur activité transcriptionnelle. Aussi, l'induction de l'activité de la p38 MAPK pourrait induire la phosphorylation de l'histone H3 au promoteur SAA2 et permettre le recrutement de certaines acétyltransférases comme la p300/CBP. L'arrivée d'acétyltransférases pourrait augmenter les niveaux d'acétylation sur les histones, facilitant ainsi le recrutement des facteurs de transcription C/EBP et NF- κ B sur le promoteur. L'ajout subséquent de butyrate ou de TSA pourrait donc augmenter ou prolonger l'induction des niveaux d'acétylation au promoteur, modulant ainsi l'expression des gènes cibles. D'ailleurs, les résultats d'immunoprécipitation de la chromatine montrent que l'IL-1 β peut induire spécifiquement l'acétylation de l'histone H4 sur les promoteurs SAA2 et IL-8, en plus d'augmenter la liaison à l'ADN de NF- κ B p65, C/EBP β et C/EBP δ sur le promoteur SAA2 et d'augmenter la liaison de NF- κ B p65 et C/EBP β sur le promoteur IL-8. L'addition de butyrate augmente l'induction par l'IL-1 β des niveaux d'acétylation sur l'histone H4 ainsi que le recrutement de C/EBP β et de NF- κ B p65 au promoteur SAA2, mais ne modifie pas les changements apportés au promoteur IL-8. La composition des complexes liés au promoteur peut avoir un impact important au niveau de la régulation de l'expression du gène. Par exemple, NF- κ B p65 est considéré comme un puissant activateur de la transcription comparativement à NF- κ B p50 (Schmitz et Baeuerle, 1991; Perkins *et al.*, 1992). De plus, la surexpression de C/EBP α atténue l'induction par l'IL-1 β

de certains gènes de la phase aiguë de l'inflammation dans les cellules épithéliales intestinales de rat, contrairement aux isoformes C/EBP β et C/EBP δ (non-montré). Ainsi, la diminution de la liaison à l'ADN de l'isoforme C/EBP α au promoteur SAA2 et l'augmentation de la liaison de l'isoforme C/EBP δ pourraient jouer un rôle important au niveau de l'induction de l'expression du gène.

Les résultats obtenus par immunoprécipitation de la chromatine démontrent donc que le butyrate induit spécifiquement des modifications à la chromatine similaires et complémentaires à celles induites par l'IL-1 β sur le promoteur SAA2. En présence d'IL-1 β , le butyrate augmente l'acétylation de l'histone H4 et la liaison des activateurs transcriptionnels NF- κ B p65 et C/EBP β . Ainsi, il est possible que le butyrate induise des modifications au niveau de la structure de la chromatine au promoteur SAA2, permettant la liaison des facteurs de transcription à l'ADN tout en maintenant les niveaux d'acétylation locaux induits par l'IL-1 β . De plus, le butyrate pourrait modifier la chromatine sur d'autres sites du gène et ainsi affecter indirectement le recrutement des isoformes C/EBP et des sous-unités de NF- κ B au promoteur. Les inhibiteurs de désacétylases peuvent également induire l'acétylation des facteurs de transcription impliqués dans la régulation des gènes de réponse inflammatoire. En effet, certaines études ont démontré que l'acétylation de la sous-unité p65 du facteur de transcription NF- κ B contrôle son activité transcriptionnelle (Chen et Greene, 2003). Ainsi, il est possible que l'addition du butyrate empêche la désacétylation de p65, permettant ainsi le maintien de son activité transcriptionnelle. Bien que la régulation de l'activité de p65 par son

acétylation puisse être importante, aucune forme acétylée de p65 n'a été détectée dans les cellules Caco-2/15 (non-montré).

En conclusion, nous avons démontré que le butyrate et l'IL-1 β induisent de façon synergique l'expression du gène de réponse inflammatoire *SAA2* en établissant et en maintenant des modifications similaires et complémentaires sur le promoteur par le recrutement des facteurs de transcription C/EBP et NF- κ B. La synergie entre les inhibiteurs de désacétylases et l'IL-1 β est spécifique, puisque les niveaux d'expression du gène *IL-8* induits par l'IL-1 β sont uniquement maintenus en présence de butyrate ou de TSA. Ainsi, en plus de générer des effets globaux, les inhibiteurs de désacétylases peuvent contrôler de façon spécifique l'expression de gènes, comme démontré avec *SAA2* et *IL-8*.

2- EFFETS DIFFÉRENTIELS DU BUTYRATE LORS DE LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE MÉDIÉE PAR L'IL-1 β DANS LES CELLULES INTESTINALES ÉPITHÉLIALES HUMAINES.

Le butyrate possède des propriétés anti-inflammatoires au niveau du tube digestif, mais les mécanismes précis impliqués dans cette régulation sont inconnus. Nous démontrons ici pour la première fois dans des cellules intestinales épithéliales humaines fœtales non-transformées (HIEC-6), que le butyrate peut contrôler spécifiquement et différenciellement l'expression des gènes de réponse inflammatoire en fonction du contexte cellulaire. En l'absence de stimuli pro-inflammatoires, le butyrate permet généralement l'augmentation des niveaux d'expression des gènes de réponse inflammatoire alors qu'en présence d'IL-1 β , le butyrate exerce son rôle anti-inflammatoire en diminuant ou en augmentant l'expression des gènes induits lors de la réponse inflammatoire. Cette régulation est spécifique et implique principalement l'inhibition de désacétylases, puisque l'effet du butyrate peut être reproduit avec l'inhibiteur de désacétylases Trichostatin A.

Plusieurs études ont démontré que les niveaux d'acétylation sur les histones peuvent avoir des répercussions importantes sur l'expression des gènes de réponse inflammatoires (Huang *et al.*, 1997; Fusunyan *et al.*, 1999). Or, dans les cellules HIEC-6, les niveaux d'acétylation sur les histones sont rapidement induits en présence de butyrate. L'inhibition des désacétylases peut également affecter l'activité de certains facteurs de transcription impliqués dans la réponse inflammatoire, dont celle des facteurs de transcription NF- κ B et C/EBP, à différents niveaux (Quivy et Van Lint, 2004; Chen et Greene, 2003; Ashburner *et al.*, 2001; Kiernan *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; Désilets *et*

al., 2000; Blais *et al.*, 2005). Dans les HIEC-6, le butyrate augmente les niveaux de base de liaison à l'ADN *in vitro* des sous-unités p50 et p65 de NF- κ B, mais n'affecte pas l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B induite par l'IL-1 β . L'augmentation des niveaux de base observée ne semble pas être reliée à l'arrivée des sous-unités p65 et p50 dans le noyau (non-montré), suggérant ainsi des effets au niveau de l'affinité de NF- κ B pour son site de liaison à l'ADN. En effet, bien que la majeure partie du NF- κ B cellulaire se retrouve principalement dans le cytoplasme en absence de stimuli pro-inflammatoires, nous observons de faibles niveaux de p50 et de p65 nucléaires dans les cellules HIEC non-stimulées (Fig. 16 et non-montré). Une étude faite dans les cellules transformées de reins embryonnaires humains HEK 293 a démontré que NF- κ B dans les cellules non-stimulées formait un complexe nucléaire avec la désacétylase HDAC1, et que ce complexe diminuait l'affinité pour l'ADN de l'hétérodimère p50-p65, tout en permettant la liaison de l'homodimère p50 (Zhong *et al.*, 2002). Cette étude a également montré que, lors d'un stimulus pro-inflammatoire, l'arrivée de la forme phosphorylée de p65 au noyau provoque la formation d'un complexe avec l'acétylase CBP, permettant ainsi la liaison à l'ADN de l'hétérodimère p50-p65. Ainsi, dans les cellules HIEC-6, le butyrate pourrait affecter l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B en contrôlant la formation des complexes nucléaires formés. Il est aussi possible que l'acétylation de p50 et de p65 puisse augmenter directement leur affinité pour l'ADN, comme démontré auparavant (Chen et Greene, 2003). Quelque soit le mécanisme, l'augmentation de liaison à l'ADN de NF- κ B dans les cellules non-stimulées pourrait expliquer l'induction par le butyrate de l'expression d'un grand nombre de gènes de réponse inflammatoire dans les cellules HIEC-6, observée dans l'analyse des micropuces d'ADN (Tableau 5).

Dans les cellules HIECs traitées avec l'IL-1 β , le butyrate contrôle négativement les niveaux induits de liaison à l'ADN de C/EBP β et C/EBP δ . L'analyse des niveaux d'ARNm des C/EBPs par micropuce d'ADN indique également une régulation négative par le butyrate de l'induction de l'expression de C/EBP δ , et plutôt une augmentation des niveaux d'expression de l'isoforme C/EBP β en présence de butyrate (Tableaux 5 et 6). Ainsi, la diminution des niveaux induits de liaison à l'ADN de C/EBP δ en présence de butyrate semble être associée à une régulation au niveau transcriptionnel, tandis que la diminution de liaison à l'ADN de l'isoforme C/EBP β dépendrait d'un mécanisme supplémentaire. Entre autres, cette diminution pourrait être causée par une perte de stabilité de la protéine C/EBP β , reliée à la baisse d'expression de l'isoforme C/EBP δ . En effet, nos observations antérieures dans les cellules IEC-6 ont montré que la surexpression d'un isoforme des C/EBPs entraînait une stabilisation des autres isoformes (Gheorghiu *et al.*, 2001).

Plusieurs études ont démontré que le butyrate réprime ou augmente l'expression de divers gènes de réponse inflammatoire dans les cellules intestinales épithéliales (Wu *et al.*, 1999; Andoh *et al.*, 1999; Désilets *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2004). Dans les cellules HIEC-6, le butyrate permet l'induction synergique de l'expression du gène de réponse inflammatoire *SAA2* en présence d'IL-1 β , et n'apporte aucune modification au niveau d'expression du gène *IL-8*. Le butyrate peut donc contrôler l'expression de gènes de réponse inflammatoire de façon spécifique. Une étude effectuée dans les macrophages de souris Raw 264.7 a identifié deux classes distinctes de gènes de réponse inflammatoire contrôlées par le facteur de transcription NF- κ B: celle dont le promoteur est

constitutivement accessible au facteur de transcription NF- κ B et dont l'induction de l'expression en présence d'un stimulus pro-inflammatoire est rapide (promoters with Constitutively and Immediately Accessible, CIA), et celle dont l'accessibilité du promoteur pour le facteur de transcription NF- κ B requiert l'induction de modifications de la structure de la chromatine par un stimulus pro-inflammatoire et dont l'induction de l'expression est plus tardive (promoters with Regulated and Late Accessibility, RLA) (Saccani *et al.*, 2001). Ainsi, le butyrate aurait plutôt un impact sur la classe des RLA, dont fait partie *SAA2* selon nos résultats, en induisant les modifications sur la chromatine nécessaires afin de permettre l'accessibilité du facteur de transcription NF- κ B au promoteur. Au contraire, le gène de l'*IL-8*, étant induit rapidement et n'étant pas affecté par le butyrate, ferait plutôt partie de la classe des CIA.

L'analyse par micropuce d'ADN nous a permis d'identifier de façon plus large les gènes de réponse inflammatoire affectés par le butyrate dans les cellules HIEC-6, que ce soit en présence ou en absence d'un stimulus pro-inflammatoire (IL-1 β). L'identification des gènes dont l'expression est affectée positivement ou négativement par le butyrate a révélée que, de façon générale, l'expression d'une plus grande quantité de gènes est induite en présence de butyrate plutôt que réprimée. Cette observation avait également été faite dans des études par micropuces d'ADN sur des cellules épithéliales de côlon de souris et sur des cellules de carcinome de côlon humain (Tabuchi *et al.*, 2002; Iacomino *et al.*, 2001; Della Ragione *et al.*, 2001), et confirme le rôle de corépresseur transcriptionnel des désacétylases (Fischle *et al.*, 2001; Ayer, 1999). Aussi, l'inhibition des désacétylases induit rapidement les niveaux d'acétylation sur les histones, et cette

hyperacétylation est habituellement associée à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle dans la cellule, causée par la décondensation de la structure de la chromatine permettant une plus grande accessibilité de l'ADN à la machinerie transcriptionnelle (Eberharter et Becker, 2002). Malgré l'importance de ces effets globaux, la régulation de l'expression des gènes par le butyrate semble complexe et spécifique puisqu'un nombre considérable de gènes, bien que moindre, sont plutôt affectés négativement ou restent inaffectés par l'ajout de butyrate.

Après 8 heures, le butyrate induit l'expression d'un grand nombre de gènes de réponse inflammatoire dans les cellules HIEC-6. Une étude récemment effectuée par micropuce d'ADN dans les cellules de carcinome de poumons humains traitées pendant 24 heures avec le butyrate avait plutôt détecté une diminution de l'expression de gènes associés à la réponse inflammatoire, particulièrement des gènes induits par l'interféron γ , en présence de butyrate (Joseph *et al.*, 2004). Ainsi, il est possible que la régulation de l'expression de certains gènes de réponse inflammatoire par le butyrate soit affectée différemment dans les cellules de carcinomes. D'ailleurs, les résultats obtenus dans la première partie de cette thèse démontrent que la régulation de l'expression du gène de réponse inflammatoire *IL-8* par le butyrate est différente dans les cellules de carcinome de côlon humain Caco-2/15 (Fig. 6) comparativement à celle observée dans les cellules épithéliales intestinales humaines normales HIEC-6 (Fig. 17A). Ces différences pourraient également être expliquées par le fait que les cellules HIEC-6 sont des cellules fœtales cryptales, contrairement aux cellules de carcinome de poumon ou de côlon, ce qui pourrait potentiellement affecter leur sensibilité au butyrate.

Nos résultats suggèrent également des changements au niveau de la régulation de l'expression des gènes de réponse inflammatoire par le butyrate dépendamment du gène et des conditions entourant les cellules intestinales épithéliales. En effet, en présence d'IL-1 β , les niveaux d'expression des gènes de réponse inflammatoire semblent être généralement diminués par le butyrate, bien que certains sont affectés positivement ou demeurent inchangés, alors qu'en absence de stimuli pro-inflammatoires, l'expression de la plupart des gènes de réponse inflammatoire est surtout augmentée par le butyrate, tandis que d'autres sont plutôt diminués ou non affectés. De plus, l'expression de certains gènes, comme *CSF2* et *CXCL10*, est augmentée par l'ajout de butyrate en absence d'IL-1 β , mais diminuée par le butyrate lors de leur induction par l'IL-1 β . Ainsi, le butyrate semble contrôler les gènes de réponse inflammatoire de façon complexe et spécifique en fonction du contexte extracellulaire. Cette régulation pourrait entre autres dépendre de l'accessibilité du promoteur pour le recrutement de divers facteurs de transcription, particulièrement NF- κ B.

Bien que les facteurs de transcription NF- κ B et C/EBP ont des rôles majeurs au niveau de la régulation de l'expression des gènes de réponse inflammatoire et que la régulation de leur activité de liaison à l'ADN par le butyrate puisse avoir un impact important sur leur activité transcriptionnelle, il nous est impossible dans cette étude de montrer un lien direct entre leur régulation par le butyrate et la régulation de l'expression des gènes de réponse inflammatoire. En effet, le butyrate peut contrôler les gènes d'une même classe de façon différentielle et spécifique, indépendamment de la localisation des sites de

liaisons à l'ADN de NF- κ B présents sur leur promoteur par rapport au site d'initiation de la transcription, et indépendamment de l'emplacement chromosomique sur lequel le gène est situé (non-montré). Ceci suggère donc que, dans les cellules HIEC-6, les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes de réponse inflammatoire par le butyrate sont complexes et impliquent plusieurs facteurs.

En conclusion, nos données démontrent l'induction rapide de changements globaux dans les cellules intestinales épithéliales humaines normales HIEC-6 par le butyrate qui impliquent l'inhibition des désacétylases. Ces modifications sont spécifiques et induisent l'expression d'un nombre considérable de gènes, incluant les gènes de réponse inflammatoire, mais provoquent également la diminution de plusieurs autres gènes. Dans un contexte pro-inflammatoire, l'ajout de butyrate diminue les niveaux d'induction de la majorité des gènes de réponse inflammatoire et ce, de façon spécifique puisque l'induction de certains gènes est affectée positivement ou reste innaffectée en présence de butyrate. Ainsi, la régulation de l'expression des gènes de réponse inflammatoire par le butyrate est complexe et semble faire intervenir de multiples facteurs, incluant les facteurs de transcription C/EBP et NF- κ B.

3- MODULATION SPÉCIFIQUE DE L'EXPRESSION DE DÉSACÉTYLASES IMPLIQUÉES DANS LA RÉGULATION DE GÈNES DE RÉPONSE INFLAMMATOIRE PAR LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE.

La dernière partie de cette thèse démontre que, dans les cellules intestinales humaines, les niveaux globaux d'acétylation ainsi que l'expression de certaines HDACs sont affectés par l'état de différenciation cellulaire. Également, nous démontrons que la surexpression de différentes HDACs affecte de façon spécifique l'expression des gènes de réponse inflammatoire *SAA2* et *IL-8* dans les cellules de carcinome de côlon humain Caco-2/15.

Plusieurs évidences ont démontré que l'inhibition de désacétylases par le butyrate pouvait contrôler les niveaux de prolifération et de différenciation dans les cellules épithéliales intestinales (Boffa *et al.* 1992; Siavishian *et al.*, 2000; Mariadason *et al.*, 2001; Blottière *et al.*, 2003). Aussi, les résultats obtenus précédemment par micropuces d'ADN ont démontré que l'inhibition des désacétylases pouvait affecter l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, le cycle cellulaire, l'apoptose et diverses voies de signalisation dans les cellules intestinales épithéliales humaines HIEC-6. Dans les cellules Caco-2/15, l'inhibition des désacétylases induit rapidement les niveaux globaux d'acétylation sur les histones dans les cellules de carcinome de côlon humain Caco-2/15 à sous-confluence ou à post-confluence. Cependant, les niveaux d'acétylation dans les cellules post-confluentes disparaissent après 24 heures de traitement, alors que ceux observés dans les cellules sous-confluentes sont maintenus. La diminution relativement rapide des niveaux d'acétylation dans les cellules post-confluentes pourrait être due à une augmentation de la métabolisation du butyrate et l'instabilité du TSA dans ces cellules (Mariadason *et al.*, 2001; Siavoshian *et al.*, 2000). Également, l'altération des

mécanismes de phosphorylation dans les cellules différenciées ou en arrêt de prolifération (Taupin et Podolsky, 1999; Aliaga *et al.*, 1999; Houde *et al.*, 2001) pourrait donner une autre explication pour la diminution des niveaux d'acétylation dans les cellules post-confluentes, puisque plusieurs évidences ont démontré que l'activité acétyltransférase ainsi que l'acétylation des histones pouvaient être directement contrôlée par la phosphorylation (Clayton et Mahadevan, 2003; Ramaswamy *et al.*, 2003; Merienne *et al.*, 2001; Canettieri *et al.*, 2003). La diminution des niveaux globaux d'acétylation dans la villosité épithéliale intestinale foetale est également observée, confirmant la possibilité d'une certaine résistance à l'acétylation dans les cellules différenciées. Cette diminution des niveaux d'acétylation globaux pourrait avoir un impact important dans les processus de différenciation cellulaire. Entre autres, une étude effectuée dans *Xenopus laevis* a démontré que l'inhibition de la désacétylation de l'histone H4 par l'ajout de butyrate affecte considérablement le développement de l'embryon (Dimitrov *et al.*, 1993).

Chez la souris, la désacétylase HDAC1 semble être responsable de la majorité de l'activité désacétylase lors du développement embryonnaire, participant grandement à la prolifération cellulaire, et les souris invalidées pour cette désacétylase meurent 10 jours après le début de l'embryogenèse (Lagger *et al.*, 2002). Dans l'épithélium intestinal foetal humain, d'importants niveaux d'expression de HDAC1 sont détectés dans les cellules de la crypte, et de façon un peu moins importante dans les cellules de la villosité. Pour sa part, HDAC3 est exprimée faiblement dans les cellules de la crypte et sa présence est pratiquement indétectable dans les cellules de la villosité. De plus, les niveaux de HDAC 3, HDAC 4 et HDAC 6 sont diminués dans les cellules Caco-2/15 post-confluentes, alors

que ceux de HDAC1 sont plutôt stables. Ces résultats suggèrent donc le rôle potentiel de HDACs spécifiques, comme par exemple les HDACs 1 et 3, au niveau de l'induction de la différenciation cellulaire, en réprimant spécifiquement l'expression de divers gènes impliqués dans l'arrêt de prolifération et l'induction de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. D'ailleurs, plusieurs évidences ont démontré que HDAC3 pouvait contrôler négativement l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt prolifération et l'induction de la différenciation, dont *Dlk-1*, *Gdf-11* et *Runx2* (Li *et al.*, 2005; Schroeder *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Ainsi, la diminution de l'expression de HDAC3 dans le contexte cellulaire approprié pourrait permettre l'induction des processus de différenciation cellulaire, en levant la répression transcriptionnelle sur des promoteurs précis. Aussi, une étude faite chez l'embryon de souris a également démontré une diminution de l'expression de HDAC1 et HDAC2 au cours du développement embryonnaire de l'intestin, plus précisément lors de la formation d'une villosité rudimentaire (Tou *et al.*, 2004). Le maintien de leur expression a considérablement retardé l'induction de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire, alors que l'inhibition des désacétylases a plutôt accéléré les processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales de souris. Cette étude démontrait également que la diminution de l'expression des HDACs 1 et 2 au cours du développement ne corrélait pas avec une augmentation des niveaux d'acétylation globaux sur les histones, mais était plutôt associée à l'augmentation spécifique des niveaux d'acétylation sur les promoteurs de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire, soient *Apo1 α* , *Fabpl*, *Fabpi*, et *Mt2*. Malgré le fait que l'implication des désacétylases de la classe II dans les processus de différenciation cellulaire ait été démontré précédemment (Verdel et Khochbin, 1999;

Miska *et al.*, 2001), l'absence des HDACs de la classe II dans l'épithélium intestinal fœtal humain (Fig. 21) et les tissus embryonnaires ou l'intestin fœtal de souris (Tou *et al.*, 2004), et leur présence dans les cellules de carcinome de côlon humain (Fig. 22) suggère un rôle possible de cette classe de désacétylases dans l'épithélium intestinal adulte ou lors de la carcinogenèse colonique.

La régulation de l'expression des HDACs au cours de la différenciation cellulaire des cellules intestinales épithéliales pourrait expliquer les différences observées dans les cellules Caco-2/15 sous-confluentes et post-confluentes au niveau de l'expression du gène de réponse inflammatoire *SAA2* (Fig. 6). En effet, l'IL-1 β seul permet l'induction de l'expression du gène *SAA2* dans les cellules post-confluentes, alors qu'aucun niveau d'expression n'est détecté dans les cellules sous-confluentes. Ensemble, nos résultats suggèrent que, dans les cellules sous-confluentes, la présence de diverses HDACs pourrait limiter l'accessibilité du promoteur. La diminution de l'expression de ces HDACs lors de l'atteinte de la confluence pourrait donc augmenter l'accessibilité du promoteur *SAA2*, facilitant son induction par l'IL-1 β .

Dans les cellules Caco-2/15, la surexpression des HDACs 3 et 4 diminue spécifiquement l'activité transcriptionnelle de base sur le promoteur IL-8, alors que la surexpression des HDACs 1, 3 et 4 diminue plutôt les niveaux induits par l'IL-1 β et les inhibiteurs de désacétylases de l'activité transcriptionnelle sur le promoteur *SAA2*. Ainsi, l'activité de HDACs spécifiques semble pouvoir affecter l'activation transcriptionnelle de gènes de réponse inflammatoire en fonction du contexte inflammatoire. Deux groupes de gènes de

réponse inflammatoire contrôlés par le facteur de transcription NF- κ B ont été identifiés, soit les gènes rapidement induits et dont l'accessibilité est immédiate et ceux induits plus tardivement et dont la conformation du promoteur doit être modifiée pour permettre l'accessibilité (Ben Neriah, 2002; Quivy et Van Lint, 2004). Dans les cellules Caco-2/15, l'expression de l'IL-8 est induite rapidement, suggérant donc une certaine accessibilité du promoteur IL-8 dans les cellules en absence de stimulus pro-inflammatoire. La surexpression de HDACs spécifiques recrutées au promoteur pourrait donc diminuer l'accessibilité de base de celui-ci, en diminuant par exemple les niveaux d'acétylation sur les histones. Les niveaux d'expression de SAA2 sont pour leur part induits plus tardivement (Fig. 6), suggérant ainsi l'inaccessibilité du promoteur en absence de stimulus pro-inflammatoire. La surexpression des HDACs n'affecte donc pas l'activité sur ce promoteur dans les cellules non-induites. Cependant, en présence d'un stimulus pro-inflammatoire comme l'IL-1 β , la surexpression des HDACs pourrait limiter l'augmentation de l'accessibilité sur le promoteur SAA2 et bloquer ainsi l'induction de l'expression du gène.

Bref, ces résultats suggèrent l'importance des HDACs, principalement de HDAC1 et HDAC3, au niveau des processus de différenciation cellulaire dans les cellules épithéliales intestinales humaines. Selon les évidences, l'activité de ces HDACs pourrait cibler des gènes précis et donc contrôler de façon spécifique l'expression de gènes impliqués dans divers processus cellulaires. Nos résultats suggèrent également que la diminution de la présence de certaines HDACs dans les cellules différenciées pourrait

affecter spécifiquement l'expression de gènes de réponse inflammatoire en modifiant l'accessibilité sur les promoteurs.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

L'épithélium intestinal constitue une barrière importante qui sépare l'organisme de l'environnement externe présent dans le tube digestif. Afin de maintenir l'homéostasie, l'épithélium doit pouvoir s'ajuster à la flore microbienne intestinale en établissant une certaine tolérance à celle-ci (Sansonetti, 2004). Toutefois, l'épithélium intestinal doit également être en mesure de répondre rapidement à toutes invasions ou infiltrations microbiennes. L'inflammation intestinale est donc un phénomène nécessaire permettant à la barrière épithéliale de protéger l'organisme. Cependant, une inflammation prolongée et dérégulée peut entraîner des conséquences néfastes, menant à la destruction du tissu intestinal. Certaines évidences ont démontré que le butyrate, un acide gras produit par la microflore intestinale, aurait des propriétés anti-inflammatoires au niveau de l'intestin, en ayant un impact bénéfique chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales chroniques (Scheppach *et al.*, 1992; Steinhart *et al.*, 1994; D'Argenio et Mazzacca, 1999; Topping et Clifton, 2001). Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent des effets à la fois pro- et anti-inflammatoires du butyrate sur l'expression des gènes de réponse inflammatoire, dépendamment du gène et du contexte cellulaire. Ainsi, le butyrate pourrait permettre une fine régulation de l'expression de certains gènes de réponse inflammatoire en augmentant ou diminuant leur niveau d'expression de base et en les prédisposant positivement ou négativement à une éventuelle induction lors d'un stimuli pro-inflammatoire, permettant ainsi une réponse inflammatoire rapide, efficace et contrôlée lors d'une agression par un agent pathogène.

Plusieurs évidences ont démontré que le rôle régulateur du butyrate sur l'inflammation intestinale impliquait sa capacité d'induire les niveaux globaux d'acétylation dans les cellules en inhibant l'activité des désacétylases. Cependant, les mécanismes moléculaires précis permettant la régulation de la réponse inflammatoire intestinale par le butyrate demeurent inconnus. Dans cette étude, nos principaux objectifs étaient de vérifier l'effet de l'inhibition des désacétylases par le butyrate sur l'expression de gènes de réponse inflammatoire dans les cellules épithéliales intestinales et d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation. Deux modèles cellulaires épithéliaux intestinaux ont été utilisés, soient les cellules de carcinome de côlon humain Caco-2/15 et les cellules intestinales épithéliales fœtales cryptales humaines HIEC-6. La régulation de l'expression et les modifications apportées au promoteur de deux gènes de réponse inflammatoire, le gène sérum amyloïde A2 (*SAA2*) et le gène interleukine-8 (*IL-8*), ont été évaluées en présence de butyrate ou de l'inhibiteur de désacétylases Trichostatin A (TSA), seuls ou en combinaison avec la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β . Aussi, la régulation de l'expression de HDACs spécifiques au cours de la différenciation cellulaire et leur implication au niveau de la régulation de l'activité transcriptionnelle sur les promoteurs *SAA2* et *IL-8* ont été évaluées.

D'abord, des différences importantes au niveau de la cinétique d'induction de l'expression des gènes *SAA2* et *IL-8* en présence d'IL-1 β et des inhibiteurs de désacétylases ont été observées. L'activité transcriptionnelle sur les promoteurs semble être en partie responsable de ces différences. En effet, des niveaux d'acétylation sur l'histone H3 ont été détectés sur le promoteur *IL-8* en absence de stimuli pro-

inflammatoires, tandis qu'aucun niveau d'acétylation sur les histones n'a été observé sur le promoteur *SAA2* dans ces conditions, expliquant possiblement l'induction rapide de l'expression du gène *IL-8* comparativement à celle du gène *SAA2* lors d'un traitement à l'IL-1 β . L'induction de l'expression de ces gènes varie également en fonction de l'état de différenciation cellulaire et de la nature de la cellule (cryptale normale ou cancéreuse). Les résultats obtenus par immunofluorescence dans l'épithélium intestinal fœtal humain et dans les cellules de carcinome de côlon humain Caco-2/15 à différentes confluences démontrent que l'expression de certaines HDACs peut être diminuée dans les cellules épithéliales de la villosité intestinale et à l'atteinte de la confluence des cellules Caco-2/15. Par conséquent, la diminution de la présence de HDACs dans les cellules différenciées pourrait favoriser l'induction de l'expression de certains gènes de réponse inflammatoire, comme démontré avec *SAA2* et *IL-8*, en augmentant l'accessibilité sur les promoteurs.

Le prétraitement des cellules avec l'IL-1 β ou les inhibiteurs de désacétylases permet l'induction subséquente de l'expression du gène *SAA2* par les inhibiteurs de désacétylases seuls ou par l'IL-1 β seul respectivement. Ainsi, les modifications apportées au promoteur peuvent prédisposer celui-ci à une éventuelle induction en présence de nouvelles modifications similaires et complémentaires, possiblement en augmentant l'accessibilité du promoteur par l'induction des niveaux d'acétylation sur les histones ou par le recrutement de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression du gène, comme C/EBP et NF- κ B.

L'analyse par micropuce d'ADN dans les cellules HIEC-6 nous a permis d'identifier plusieurs catégories de gènes affectés positivement ou négativement par le butyrate, dont les gènes de réponse inflammatoire. En absence ou en présence de stimuli pro-inflammatoires, le butyrate affecte spécifiquement l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire intestinale, soit en augmentant leur niveaux d'expression ou en les diminuant. Cependant, de façon générale, le butyrate affecte plutôt positivement l'expression des gènes inflammatoires dans les cellules en absence de stimuli pro-inflammatoires, mais réduit les niveaux d'induction de la plus grande partie des gènes de réponse inflammatoire en présence d'IL-1 β . Les résultats obtenus par gels de rétention dans les cellules HIEC-6 ont démontré que l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NF- κ B dans les cellules en absence d'IL-1 β était augmentée par l'inhibition des désacétylases, alors que les niveaux induits par l'IL-1 β n'étaient pas affectés par l'ajout de butyrate ou de TSA. Ensemble, ces résultats indiquent donc que l'induction de l'expression de différents gènes de réponse inflammatoire par le butyrate dans les cellules en absence d'IL-1 β pourrait être la conséquence de l'augmentation de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NF- κ B, suggérant l'accessibilité immédiate des promoteurs de ces gènes.

En conclusion, la régulation spécifique de l'expression des gènes de réponse inflammatoire par le butyrate dans les cellules intestinales épithéliales humaines pourrait expliquer en partie les effets bénéfiques du butyrate sur l'inflammation intestinale. Cette régulation semble dépendre de l'accessibilité initiale sur les promoteurs des gènes de réponse inflammatoire, du recrutement et de l'activité des facteurs de transcription

C/EBP et NF- κ B sur ces promoteurs et des niveaux d'expression de HDACs spécifiques.

L'étude des modifications sur divers promoteurs de gènes de réponse inflammatoire en présence de butyrate, seul ou en combinaison avec l'IL-1 β , en fonction du temps d'induction et de l'état de différenciation cellulaire pourrait nous permettre d'identifier plus précisément les mécanismes impliqués dans la régulation des gènes de réponse inflammatoire dans les cellules intestinales épithéliales. Nous pourrions ainsi vérifier l'accessibilité des promoteurs de gènes de réponse inflammatoire en mesurant les niveaux d'acétylation des histones initiaux ou induits, ainsi que la présence initiale, l'arrivée ou le départ de divers facteurs de transcription, dont NF- κ B, C/EBP, les HATS, divers HDACs et co-répresseurs. D'autres modifications des histones, comme la phosphorylation et la méthylation, pourraient également être évaluées. Ceci nous permettrait possiblement de corréler les différences observées dans l'induction des gènes de réponse inflammatoire et l'effet du butyrate sur leur niveau d'expression avec des modifications précises sur le promoteur. Nos résultats suggèrent également l'importance de voies de signalisation dans la régulation de l'expression des gènes de réponse inflammatoire par l'IL-1 β en présence de butyrate, dont celle de la MAPkinase p38, mais son rôle précis reste inconnu. Ainsi, l'identification des voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression des gènes de réponse inflammatoire par le butyrate pourrait également apporter de nouvelles indications quant à la spécificité de la réponse de ces gènes en présence du butyrate.

REMERCIEMENTS

Je veux tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Claude Asselin, pour la qualité de la formation scientifique qu'il m'a donnée. Son support constant, sa disponibilité, sa compréhension, sa confiance et sa franchise tout au long de mes années d'études ont été grandement appréciés. Sa passion pour la recherche et son dévouement pour ses étudiants et son laboratoire ont été pour moi une grande source d'inspiration.

Je voudrais également remercier Dre Nathalie Rivard et Dr François Boudreau pour leur intérêt et leurs critiques constructives face à mon projet de doctorat.

Je remercie Anne Vézina pour les coupes de tissus d'épithélium intestinal fœtal humain et Claude Deschênes pour son aide lors de l'élaboration du protocole d'immunofluorescence.

Je remercie également le Dr Jean-François Beaulieu pour les cellules HIEC-6, ainsi que le Dr Christian Jobin pour les vecteurs d'expression IL-8.

Je remercie le Dr Luc Gaudreau et son étudiante Maryse Berthiaume pour leurs judicieux conseils lors de la mise au point du protocole d'immunoprécipitation de la chromatine.

Je remercie les différents stagiaires qui ont contribué à l'avancement de mes travaux de doctorat. Je tiens également à remercier tous les collègues de laboratoire avec qui j'ai eu la chance de travailler. Les longues heures passées en laboratoire ont été des plus plaisantes grâce à leur présence.

Je tiens à remercier mon mari, Andrew, et ma famille pour leur soutien moral et leur encouragement depuis le tout début.

Finalement, je remercie le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) pour avoir financé mes études, ainsi que la Fondation Canadienne des Maladies Inflammatoires de l'Intestin (FCMII) et les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) pour le financement de ce projet.

BIBLIOGRAPHIE

- Aliaga J.C., Deschênes C., Beaulieu J.F., Calvo E.L. et Rivard N. (1999) Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am. J. Physiol.* **277**: G631-G641.
- Andoh A., Fujiyama Y., Araki K., Takaya Y., Shimada M. et Bamba T. (1999) Counter-regulatory effect of sodium NaBu on tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced complement C3 and factor B biosynthesis in human intestinal epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* **118**: 23-29.
- Andoh A., Shimada M., Araki Y., Fujiyama Y. et Bamba T. (2002) Sodium butyrate enhances complement-mediated cell injury via down-regulation of decay-accelerating factor expression in colonic cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **50**: 663-672.
- Archer S.Y. et Hodin R.A. (1999) Histone acetylation and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 171-174.
- Ashburner B.P., Westerheide S.D. et Baldwin A.S. Jr. (2001) The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 7065-7077.
- Ayer D.E. (1999) Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends Cell. Biol.* **9**: 193-198.
- Backhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A. et Gordon J.I. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**: 1915-1920.
- Beaulieu J.F. et Quaroni A. (1991) Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem. J.* **280**: 599-608.
- Ben Neriah Y. (2002) Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat. Immunol.* **3**: 20-26.
- Blais M., Désilets A. et Asselin C. (2005) Synergy between deacetylase inhibitors and IL-1beta in activation of the serum amyloid A2 gene promoter. *DNA Cell. Biol.* **24**: 209-217.

- Blottière H.M., Buecher B., Galmiche J.P. et Cherbut C. (2003) Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proc. Nutr. Soc.* **62**: 101-106.
- Boffa L.C., Lupton J.R., Mariani M.R., Ceppi M., Newmark H.L., Scalmati A. et Lipkin M. (1992) Modulation of colonic epithelial cell proliferation, histone acetylation, and luminal short chain fatty acids by variation of dietary fiber (wheat bran) in rats. *Cancer Res.* **52**: 5906-5912.
- Boffa L.C., Mariani M.R. et Parker M.I. (1994) Selective hypermethylation of transcribed nucleosomal DNA by sodium butyrate. *Exp. Cell Res.* **211**: 420-423.
- Butler L.M., Agus D.B., Scher H.I., Higgins B., Rose A., Cordon-Cardo C., Thaler H.T., Rifkind R.A., Marks P.A. et Richon V.M. (2000) Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **60**: 5165-5170.
- Canettieri G., Morante I., Guzman E., Asahara H., Herzig S., Anderson S.D., Yates J.R. 3rd et Montminy M. (2003) Attenuation of a phosphorylation-dependent activator by an HDAC-PP1 complex. *Nat. Struct. Biol.* **10**: 175-181.
- Chen L.F. et Greene W.C. (2003) Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *J. Mol. Med.* **81**: 549-557.
- Clayton A.L. et Mahadevan L.C. (2003) MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation. *FEBS Lett.* **546**: 51-58.
- Cosgrove M.S. et Wolberger C. (2005) How does the histone code work? *Biochem. Cell Biol.* **83**: 468-476.
- Cress W.D. et Seto E. (2000) Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J. Cell. Physiol.* **184**: 1-16.
- Cuff, M.A., Lambert, D.W. and Shirazi-Beechey, S.P. (2002) Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J. Physiol.* **539**: 361-371.
- Cummings J.H. (1984) Colonic absorption: the importance of short chain fatty acids in man. *Scand. J. Gastroenterol.* **19**: 89-99.

- D'Argenio G. et Mazzacca G. (1999) Short-chain fatty acid in the human colon. Relation to inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **472**: 149-158.
- Davie J.R. (2003) Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J. Nutr.* **133**: 2485-2493.
- Della Ragione F., Criniti V., Della Pietra V., Borriello A., Oliva A., Indaco S., Yamamoto T. et Zappia V. (2001) Genes modulated by histone acetylation as new effectors of NaBu activity. *FEBS Lett.* **499**: 199-204.
- de Ruijter A.J., van Gennip A.H., Caron H.N., Kemp S. et van Kuilenburg A.B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* **370**: 737-749.
- Deschênes C., Vezina A., Beaulieu J.F. et Rivard N. (2001) Role of p27 (Kip1) in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* **120**: 423-438.
- Désilets A., Gheorghiu I., Yu S.J., Seidman E.G. et Asselin C. (2000) Inhibition by deacetylase inhibitors of IL-1-dependent induction of haptoglobin involves CCAAT/Enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**: 673-679.
- de Villiers W.J., Varilek G.W., de Beer F.C., Guo J.T. et Kindy M.S. (2000) Increased serum amyloid a levels reflect colitis severity and precede amyloid formation in IL-2 knockout mice. *Cytokine* **12**: 1337-1347.
- Dimitrov S., Almouzni M.D. et Wolffe A.P. (1993) Chromatin transitions during early *Xenopus* embryogenesis: changes in histone H4 acetylation and in linker histone type. *Dev. Biol.* **160**: 214-227.
- Eberharter A. et Becker P.B. (2002) Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* **3**: 224-229.
- Erickson R.L., Hemati N., Ross S.E. et MacDougald O.A. (2001) p300 coactivates the adipogenic transcription factor CCAAT/Enhancer-binding protein. *J. Biol. Chem.* **276**: 16348-16355.
- Feghali C.A. et Wright T.M. (1997) Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Bioscience* **2**: 12-16.

- Fischle W., Kiermer V., Dequiedt F. et Verdin E. (2001) The emerging role of class II histone deacetylases. *Biochem. Cell. Biol.* **79**: 337-348.
- Fukushima K., Ogawa H., Kitayama T., Yamada T., Naito H., Funayama Y., Matsuno S. et Sasaki I. (2002) Epithelial induction of serum amyloid A in experimental mucosal inflammation. *Dig. Dis. Sci.* **47**: 1438-1446.
- Furlaneto C.J. et Campa A. (2000) A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-8 by human blood neutrophil. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**: 405-408.
- Fusunyan R.D., Quinn J.J., Fujimoto M., MacDermott R.P. et Sanderson I.R. (1999) Butyrate switches the pattern of chemokine secretion by intestinal epithelial cells through histone acetylation. *Mol. Med.* **5**: 631-640.
- Fusunyan R.D., Quinn J.J., Ohno Y., MacDermott R.P. et Sanderson I.R. (1998) Butyrate enhances interleukin (IL)-8 secretion by intestinal epithelial cells in response to IL-1 β and lipopolysaccharide. *Pediatr. Res.* **43**: 84-90.
- Gabay C. et Kushner I. (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* **340**: 448-454.
- Gibson P.R., Rosella O., Wilson A.J., Mariadason J.M., Rickard K., Byron K. et Barkla D.H. (1999) Colonic epithelial cell activation and the paradoxical effects of butyrate. *Carcinogenesis* **20**: 539-544.
- Gheorghiu I., Deschênes C., Blais M., Boudreau F., Rivard N. et Asselin C. (2001) Role of specific CCAAT/enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 44331-44337.
- Ghosh S. et Karin M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109**: 82-96.
- Hagihara K., Nishikawa T., Isobe T., Song J., Sugamata Y. et Yoshizaki K. (2004) IL-6 plays a critical role in the synergistic induction of human serum amyloid A (SAA) gene when stimulated with proinflammatory cytokines as analyzed with an SAA isoform real-time quantitative RT-PCR assay system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314**: 363-369.

- Hague A., Diaz G.D., Hicks D.J., Krajewski S., Reed J.C. et Paraskeva C. (1997) Bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis. *Int. J. Cancer* **72**: 898–905.
- Hardardottir I., Sipe J., Moser A.H., Fielding C.J., Feingold K.R. et Grunfeld C. (1997) LPS and cytokines regulate extra hepatic mRNA levels of apolipoproteins during the acute phase response in Syrian hamsters. *Biochim. Biophys. Acta* **1344**: 210-220.
- Heruth D.P., Zirnstein G.W., Bradley J.F. et Rothberg P.G. (1993) Sodium butyrate causes an increase in the block to transcriptional elongation in the c-myc gene in SW837 rectal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 20466–20472.
- Hinnebusch B.F., Meng S., Wu J.T., Archer S.Y. et Hodin R.A. (2002) The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J. Nutr.* **132**: 1012–1017.
- Hoffmann E., Dittrich-Breiholz O., Holtmann H. et Kracht M. (2002) Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **72**: 847-855.
- Houde M., Laprise P., Jean D., Blais M., Asselin C. et Rivard N. (2001) Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J. Biol. Chem.* **276**: 21885-21894.
- Huang N., Katz J.P., Martin D.R. et Wu G.D. (1997) Inhibition of IL-8 gene expression in Caco-2 cells by compounds which induce histone hyperacetylation. *Cytokine* **9**: 27-36.
- Iacomino G., Tecce M.F., Grimaldi C., Tosto M. et Russo G.L. (2001) Transcriptional response of a human colon adenocarcinoma cell line to sodium NaBu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**: 1280-1289.
- Inan M.S., Rasoulpour R.J., Yin L., Hubbard A.K., Rosenberg D.W. et Giardina C. (2000) The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* **118**: 724-734.

- Jijon H.B., Panenka W.J., Madsen K.L. et Parsons H.G. (2002) MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **283**: C31-C41.
- Jobin C., Holt L., Bradham C.A., Streetz K., Brenner D.A. et Sartor R.B. (1999) TNF receptor-associated factor-2 is involved in both IL-1 beta and TNF-alpha signaling cascades leading to NF-kappa B activation and IL-8 expression in human intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* **162**: 4447-4454.
- Joseph J., Mudduluru G., Antony S., Vashistha S., Ajitkumar P. et Somasundaram K. (2004) Expression profiling of sodium NaBu (NaB)-treated cells: identification of regulation of genes related to cytokine signaling and cancer metastasis by NaB. *Oncogene* **23**: 6304-6315.
- Kalina U., Koyama N., Hosoda T., Nuernberger H., Sato K., Hoelzer D., Herweck F., Manigold T., Singer M.V., Rossol S. et Bocker U. (2002) Enhanced production of IL-18 in butyrate-treated intestinal epithelium by stimulation of the proximal promoter region. *Eur. J. Immunol.* **32**: 2635-2643.
- Kiernan R., Brès V., Ng R.W., Coudart M.P., El Messaoudi S., Sardet C., Jin D.Y., Emiliani S. et Benkirane M. (2003) Post-activation turn-off of NF-kappaB-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J. Biol. Chem.* **278**: 2758-2766.
- Kovács K.A., Steinmann M., Magistretti P.J., Halfon O. et Cardinaux J.R. (2003) CCAAT/Enhancer-binding protein family members recruit the coactivator CREB-binding protein and trigger its phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278**: 36959-36965.
- Lagger G., O'Carroll D., Rembold M., Khier H., Tischler J., Weitzer G., Schuettengruber B., Hauser C., Brunmeir R., Jenuwein T. et Seiser C. (2002) Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J.* **21**: 2672-2681.
- Lemischka I.R., Farmer S., Racaniello V.R. et Sharp P.A. (1981) Nucleotide sequence and evolution of a mammalian alpha-tubulin messenger RNA. *J. Mol. Biol.* **151**: 101-120.

- Li D., Yea S., Li S., Chen Z., Narla G., Banck M., Laborda J., Tan S., Friedman J.M., Friedman S.L. et Walsh M.J. (2005) KLF6 promotes preadipocyte differentiation through histone deacetylase 3 (HDAC3)-dependent repression of Dlk1. *J. Biol. Chem.* **280**: 26941-26952.
- Li L.F., Ouyang B., Choukroun G., Matyal R., Mascarenhas M., Jafari B., Bonventre J.V., Force T. et Quinn D.A. (2003) Stretch-induced IL-8 depends on c-Jun NH2-terminal and nuclear factor-kappaB-inducing kinases. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **285**: L464-L475.
- Luhrs H., Gerke T., Boxberger F., Backhaus K., Melcher R., Scheppach W. et Menzel T. (2001) Butyrate inhibits interleukin-1-mediated nuclear factor-kappa B activation in human epithelial cells. *Dig. Dis. Sci.* **46**: 1968-1973.
- Luhrs H., Gerke T., Schaubert J., Dusel G., Melcher R., Scheppach W. et Menzel T. (2001) Cytokine-activated degradation of inhibitory kappaB protein alpha is inhibited by the short-chain fatty acid butyrate. *Int. J. Colorectal Dis.* **16**: 195-201.
- MacDermott R.P. (1999) Chemokines in the inflammatory bowel diseases. *J. Clin. Immunol.* **19**: 266-272.
- Mandal M., Olson D.J., Sharma T., Vadlamudi R.K. et Kumar R. (2001) Butyric acid induces apoptosis by up-regulating Bax expression via stimulation of the c-Jun N-terminal kinase/activation protein-1 pathway in human colon cancer cells. *Gastroenterology* **120**: 71-78.
- Mariadason J.M., Corner G.A. et Augenlicht L.H. (2000) Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res.* **60**: 4561-4572.
- Mariadason J.M., Velcich A., Wilson A.J., Augenlicht L.H. et Gibson P.R. (2001) Resistance to butyrate-induced cell differentiation and apoptosis during spontaneous Caco-2 cell differentiation. *Gastroenterology* **120**: 889-899.
- Mariani M.R., Carpaneto E.M., Ulivi M., Allfrey V.G. et Boffa L.C. (2003) Correlation between butyrate-induced histone hyperacetylation turn-over and c-myc expression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **86**: 167-171.

- Marinkovic S. et Baumann H. (1990) Structure, hormonal regulation, and identification of the interleukin-6- and dexamethasone-responsive element of the rat haptoglobin gene. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 1573-1583.
- McKnight G.S., Hager L. et Palmiter R.D. (1980) Butyrate and related inhibitors of histone deacetylation block the induction of egg white genes by steroid hormones. *Cell* **22**: 469-477.
- McMillan L., Butcher S.K., Pongracz J. et Lord J.M. (2003) Opposing effects of butyrate and bile acids on apoptosis of human colon adenoma cells: differential activation of PKC and MAP kinases. *Br. J. Cancer* **88**: 748–753.
- McKnight S. (2001) McBindall- a better name for CCAAT/Enhancer Binding Proteins? *Cell* **107**: 259-261.
- Medina V., Edmonds B., Young G.P., James R., Appleton S. et Zalewski P.D. (1997) Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res.* **57**: 3697-3707.
- Merienne K., Pannetier S., Harel-Bellan A. et Sassone-Corsi P. (2001) Mitogen-regulated RSK2-CBP interaction controls their kinase and acetylase activities. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 7089-7096.
- Miller M.D. et Krangel M.S. (1992) Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit. Rev. Immunol.* **12**: 17-46.
- Miska E.A., Langley E., Wolf D., Karlsson C., Pines J. et Kouzarides T. (2001) Differential localization of HDAC4 orchestrates muscle differentiation. *Nucl. Acids Res.* **29**: 3439-3447.
- Mukaida N., Okamoto S., Ishikawa Y. et Matsushima K. (1994) Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **56**: 554–558.
- Niederau C., Backmerhoff F., Schumacher B. et Niederau C. (1997) Inflammatory mediators and acute phase proteins in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* **44**: 90-107.

- Ohno Y., Lee J., Fusunyan R.D., MacDermott R.P. et Sanderson I.R. (1997) Macrophage inflammatory protein-2: chromosomal regulation in rat small intestinal epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 10279-10284.
- Parhar K., Ray A., Steinbrecher U., Nelson C. et Salh B. (2003) The p38 mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-1beta-induced IL-8 expression via an effect on the IL-8 promoter in intestinal epithelial cells. *Immunology* **108**: 502-512.
- Pelletier N., Boudreau F., Yu S.J., Zannoni S., Boulanger V. et Asselin C. (1998) Activation of haptoglobin gene expression by cAMP involves CCAAT/enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells. *FEBS Lett.* **20**: 275-280.
- Perkins N.D., Schmid R.M., Duckett C.S., Leung K., Rice N.R. et Nabel G.J. (1992) Distinct combinations of NF- κ B subunits determine the specificity of transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1529-1533.
- Perreault N. et Beaulieu J.F. (1996) Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp. Cell. Res.* **224**: 354-364.
- Polevoda B. et Sherman F. (2002) The diversity of acetylated proteins. *Genome Biol.* **3**: 1-6.
- Poli V. (1998) The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J. Biol. Chem.* **273**: 29279-29282.
- Quivy V. et Van Lint C. (2004) Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochem. Pharmacol.* **68**: 1221-1229.
- Radtke F. et Clevers H. (2005) Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* **307**: 1904-1909.
- Ramaswamy V., Williams J.S., Robinson K.M., Sopko R.L. et Schultz M.C. (2003) Global control of histone modification by the anaphase-promoting complex. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 9136-9149.
- Ramji D.P. et FOKA P. (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem. J.* **365**: 561-575.

- Richon V.M., Emiliani S., Verdin E., Webb Y., Breslow R., Rifkind R.A. et Marks P.A. (1998) A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3003-3007.
- Ritzhaupt, A., Ellis, A., Hosie, K.B. and Shirazi-Beechey, S.P. (1998) The characterization of butyrate transport across pig and human colonic luminal membrane. *J. Physiol.* **507**: 819-830.
- Saccani S., Pantano S. et Natoli G. (2001) Two waves of nuclear factor κ B recruitment to target promoters. *J. Exp. Med.* **193**: 1351-1359.
- Saccani S., Pantano S. et Natoli G. (2002) p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat. Immunol.* **3**: 69-75.
- Sambrook J. et Russell D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, vol.2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.40: 13.36-13.39.
- Sansonetti P.J. (2004) War and peace at mucosal surfaces. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 953-964.
- Scheppach W., Sommer H., Kirchner T., Paganelli G.M., Bartram P., Christl S., Richter F., Dusel G. et Kasper H. (1992) Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* **103**: 51-56.
- Schmitz M.L. et Baeuerle P.A. (1991) The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF- κ B. *EMBO J.* **10**: 3805-3817.
- Schroeder T.M., Kahler R.A., Li X. et Westendorf J.J. (2004) Histone deacetylase 3 interacts with runx2 to repress the osteocalcin promoter and regulate osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* **279**: 41998-42007.
- Ségain J.P., Raingeard de la Bletière D., Bourreille A., Leray V., Gervois N., Rosales C., Ferrier L., Bonnet C., Blottiere H.M. et Galmiche J.P. (2000) Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* **47**: 397-403.
- Sengupta N. et Seto E. (2004) Regulation of histone deacetylase activities. *J. Cell. Biochem.* **93**: 57-67.

- Siavoshian S., Blottiere H.M., Bentouimou N., Cherbut C. et Galmiche J.P. (1996) Butyrate enhances major histocompatibility complex class I, HLA-DR and ICAM-1 antigen expression on differentiated human intestinal epithelial cells. *Eur. J. Clin. Invest.* **26**: 803-810.
- Siavoshian S., Ségain J.P., Kornprobst M., Bonnet C., Cherbut C., Galmiche J.P. et Blottière H.M. (2000) Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* **46**: 507-514.
- Souleimani A. et Asselin C. (1993) Regulation of c-myc expression by sodium butyrate in the colon carcinoma cell line Caco-2. *FEBS Lett.* **326**: 45-50.
- Souleimani A. et Asselin C. (1993) Regulation of C-fos expression by sodium butyrate in the human colon carcinoma cell line Caco-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**: 330-336.
- Soutoglou E., Katrakili N. et Talianidis I. (2000) Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol. Cell.* **5**: 745-751.
- Svoltelis A., Doyon G., Bernatchez G., Désilets A., Rivard N. et Asselin C. (2005) IL-1 beta-dependent regulation of C/EBP delta transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**: 461-470.
- Steel D.M., Donoghue F.C., O'Neill R.M., Uhlar C.M. et Whitehead A.S. (1996) Expression and regulation of constitutive and acute phase serum amyloid A mRNAs in hepatic and non-hepatic cell lines. *Scand. J. Immunol.* **44**: 493-500.
- Steinhart A.H., Brzezinski A. et Baker J.P. (1994) Treatment of refractory ulceratice proctosigmoiditis with butyrate enemas. *Am. J. Gastroenterol.* **89**: 179-183.
- Suzuki H., Gabrielson E., Chen W., Anbazhagan R., van Engeland M., Weijenberg M.P., Herman J.G., et Baylin S.B. (2002) A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat. Genet.* **31**: 141-149.
- Tabuchi Y., Arai Y., Kondo T., Takeguchi N. et Asano S. (2002) Identification of genes responsive to sodium NaBu in colonic epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**: 1287-1294.

- Taupin D. et Podolsky D.K. (1999) Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. *Gastroenterology* **116**: 1072-1080.
- Thorn C.F., Lu Z.Y. et Whitehead A.S. (2004) Regulation of the human acute phase serum amyloid A genes by tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and glucocorticoids in hepatic and epithelial cell lines. *Scand. J. Immunol.* **59**: 152-158.
- Tong X., Yin L. et Giardina C. (2004) NaBu suppresses Cox-2 activation in colon cancer cells through HDAC inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**: 463-471.
- Tong X., Yin L., Joshi S., Rosenberg D.W. et Giardina C. (2005) Cyclooxygenase-2 regulation in colon cancer cells: modulation of RNA polymerase II elongation by histone deacetylase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **280**: 15503-15509.
- Topping D.L. et Clifton P.M. (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.* **81**: 1031-1064.
- Tou L., Liu Q. et Shivdasani R.A. (2004) Regulation of mammalian epithelial differentiation and intestine development by class I histone deacetylases. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 3132-3139.
- Uhlar C.M., Grehan S., Steel D.M., Steinkasserer A. et Whitehead A.S. (1997) Use of the acute phase serum amyloid A2 (SAA2) gene promoter in the analysis of pro- and anti-inflammatory mediators: differential kinetics of SAA2 promoter induction by IL-1 beta and TNF-alpha compared to IL-6. *J. Immunol. Meth.* **203**: 123-130.
- Uhlar C.M. et Whitehead A.S. (1999) Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur. J. Biochem.* **265**: 501-523.
- Urieli-Shoval S., Linke R.P. et Matzner Y. (2000) Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr. Opin. Hematol.* **7**: 64-69.
- Venkatraman A., Ramakrishna B.S., Shaji R.V., Kumar N.S., Pulimood A. et Patra S. (2003) Amelioration of dextran sulfate colitis by butyrate: role of heat

shock protein 70 and NF-kappaB. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **285**: G177-G184.

- Verdel A. et Khochbin S. (1999) Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J. Biol. Chem.* **274**: 2440-2445.
- Villard J. (2004) Transcription regulation and human diseases. *Swiss Med. Wkly.* **134**: 571-579.
- Vreugdenhil A.C., Dentener M.A., Snoek A.M., Greve J.W. et Buurman W.A. (1999) Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response. *J. Immunol.* **163**: 2792-2798.
- Wang J., Sauntharajah Y., Redner R.L. et Liu J.M. (1999) Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells. *Cancer Res.* **59**: 2766-2769.
- Wu G.D., Huang N., Wen X., Keilbaugh S.A. et Yang H. (1999) High-level expression of I kappa B-beta in the surface epithelium of the colon: in vitro evidence for an immunomodulatory role. *J. Leukoc. Biol.* **66**: 1049-1056.
- Wu G.D., Lai E.J., Huang N. et Wen X. (1997) Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* **272**: 2396-2403.
- Xie K. (2001) Interleukin-8 and human cancer biology. *Cyt. Growth Factor Rev.* **12**: 375-391.
- Xu M., Nie L., Kim S.H. et Sun X.H. (2003) STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta. *EMBO J.* **22**: 893-904.
- Yang, J., Kawai, Y., Hanson, R.W. and Arinze, I.J. (2001) Sodium butyrate induces transcription from the G alpha(i2) gene promoter through multiple Sp1 sites in the promoter and by activating the MEK-ERK signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **276**: 25742-25752.

- Yin L., Laevsky G. et Giardina C. (2001) Butyrate suppression of colonocyte NF-kappa B activation and cellular proteasome activity. *J. Biol. Chem.* **276**: 44641-44646.
- Yoshida M., Horinouchi S. et Beppu T. (1995) Trichostatin A and trapoxin : novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays* **17**: 423-430.
- Zhang X., Wharton W., Yuan Z., Tsai S.C., Olashaw N. et Seto E. (2004) Activation of the growth-differentiation factor 11 gene by the histone deacetylase (HDAC) inhibitor trichostatin A and repression by HDAC3. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 5106-5118.
- Zhong H., May M.J., Jimi E. et Ghosh S. (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell* **9**: 625-636.